

530 203

**L'UNIVERSITE DE PROVENCE, AIX-MARSEILLE I**  
**MENTION BIOSCIENCES ENVIRONNEMENT CHIMIE SANTE**

N° attribué par la bibliothèque /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/

**THESE**

**Pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PROVENCE, AIX-MARSEILLE I**  
**Discipline : BIOSCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT, CHIMIE ET SANTE**

**ECOLE DOCTORALE : Sciences de l'Environnement**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par**

**Alba ZAREMSKI**

**Le 14 Juin 2005**

**Titre**

**Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : caractérisation  
taxinomique, phylogénie et détection précoce des champignons dans le bois.**

**Directeur de thèse :**

**Monsieur Jean Luc CLEMENT**

**DOUBLE**

**JURY**

Monsieur Marcel ASTHER

Rapporteur

Monsieur Philippe GERARDIN

Rapporteur

Monsieur Jean Luc CLEMENT

Examineur

Madame Catherine MASSIANI

Présidente

Monsieur Edmond WOZNIAK

Examineur

Monsieur Marc DUCOUSSO

Examineur

**CIRAD-Dist**  
**UNITÉ BIBLIOTHÈQUE**  
**Baillarguet**

CIRAD



\*000073203\*





**L'UNIVERSITE DE PROVENCE, AIX-MARSEILLE I**  
**MENTION BIOSCIENCES ENVIRONNEMENT CHIMIE SANTE**

N° attribué par la bibliothèque /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_

**THESE**

**Pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PROVENCE, AIX-MARSEILLE I**  
**Discipline : BIOSCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT, CHIMIE ET SANTE**

**ECOLE DOCTORALE : Sciences de l'Environnement**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par**

**Alba ZAREMSKI**

**Le 14 Juin 2005**

**Titre**

**Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : caractérisation  
taxinomique, phylogénie et détection précoce des champignons dans le bois.**

**Directeur de thèse :**

**Monsieur Jean Luc CLEMENT**

**JURY**

Monsieur Marcel ASTHER	Rapporteur
Monsieur Philippe GERARDIN	Rapporteur
Monsieur Jean Luc CLEMENT	Examineur
Madame Catherine MASSIANI	Présidente
Monsieur Edmond WOZNIAK	Examineur
Monsieur Marc DUCOUSSO	Examineur

---

**RESUME en français**

Après une revue bibliographique de nos connaissances du bois puis des champignons qui le dégradent, trois chapitres sont développés afin de mieux comprendre l'organisation de la diversité des champignons qui dégradent le bois pour, à terme, en optimiser les usages.

Une étude taxinomique (PCR-RFLP et séquençage des ITS) a été menée sur 98 Basidiomycètes dégradant le bois en pourriture fibreuse ou cubique. L'analyse des poids moléculaires des amplifiats a permis de définir deux groupes d'isolats : un premier avec un ITS d'environ 635 paires de bases et un second avec une longueur voisine de 725 paires de bases. L'utilisation d'enzymes de restriction a permis de caractériser la diversité de ces isolats. L'imprécision de lecture des poids moléculaires des amplifiats et des fragments de restriction a été estimée à 12 %. En partie de ce fait, l'utilisation des séquences paraît mieux adaptée à l'étude taxinomique de ce groupe de champignon, y compris la détermination de la longueur des ITS.

L'analyse phylogénétique des séquences ITS réalisée sur 57 souches et 96 séquences de référence a permis de mettre en évidence des groupes de souches de pourriture cubique distincts des groupes de souches de pourritures fibreuses mettant en évidence des relations entre phylogénie et fonction. Ces analyses ont également permis de préciser la position taxinomique d'isolats indéterminés.

Enfin, un outil de détection précoce des champignons dans différents bois a été développé. Pour cela, le bois de cinq essences différentes a été infecté par cinq souches différentes. Malgré des pertes de masse souvent inférieures à 5 %, indicatrice d'un très faible niveau d'attaque, une séquence d'ADN homologue de la souche utilisée a été retrouvée dans 21 des 25 combinaisons bois/champignon testées, démontrant la pertinence de cette méthode.

Ces travaux permettent d'envisager des innovations dans le domaine de la préservation du bois.

---

**TITRE en anglais Aphylophorales involved in wood decay: taxonomical characterisation, phylogeny and early detection of infection.**

---

**RESUME en anglais**

After a review of our knowledge about wood and wood decaying fungi, three chapters are developed to improve our understanding of the organization of wood decaying fungi diversity to optimize wood uses.

A taxonomical study (PCR-RFLP and ITS sequencing) was carried out on 98 Basidiomycetes degrading wood in cubic and fibrous rots. The analysis of ITS molecular weight allowed to define two clusters: one having an about 635 bases pairs ITS and a second having a 725 bases pairs ITS. Genomic diversity within these isolates has been specified using restriction enzymes. Error in molecular weight assessment of PCR products and restriction fragments was of 12 %. Partly because of that fact, the use of sequencing appeared better adapted for taxonomical studies, including the assessment of ITS length.

The phylogenetical analyses of ITS performed on 57 collection strains and 96 data bank sequences allowed to evidence groups of cubic rots distinct from groups of fibrous rots. These analyses permitted to evidence relationships between phylogeny and function and to specify the taxonomical position of unidentified strains.

Lastly, a tool for the early detection of fungi in different wood has been developed. For that purpose, five different woods have been infected by five different strains. In spite of weight losses, generally below 5 % indicating a very low level of infection, a DNA sequence homologous to the strain used was obtained in 21 of the 25 wood/fungus combination tested, demonstrating the pertinence of this method.

The work opened new possibilities for further development in the field of wood preservation.

---

**DISCIPLINE – SPECIALITE DOCTORALE BIOSCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT, CHIMIE ET SANTE**

---

**MOTS-CLES :** Champignons du bois, Pourriture fibreuse, Pourriture cubique, ADN ribosomique, Taxinomie moléculaire, Phylogénie, Détection précoce.

**KEY WORDS:** Wood fungi, Fibrous rot, Cubic rot, Ribosomal DNA, Molecular taxonomy, Phylogeny, Early detection

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE**

**Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier (UMR 113)**

---

## AVANT- PROPOS

Le présent mémoire, constitutif d'une thèse, est issu d'une réflexion initiée par mon expérience professionnelle et les formations diplômantes acquises depuis 1994 au laboratoire de préservation des Bois Tropicaux du département Forêt du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) de Montpellier.

Au sein de ce laboratoire, j'ai été chargée de la réalisation des essais de durabilité naturelle des bois tropicaux en vue de tester l'efficacité de produits de préservation pour l'industrie. J'ai également travaillé à la mise au point de produits de préservation des bois, insecticides et fongicides, à faible impact environnemental. Enfin, j'ai initié de nouvelles techniques, principalement en biologie moléculaire, afin d'améliorer la gestion des souches de champignons du laboratoire et obtenir à terme la mise au point d'une méthode sur la détection précoce d'attaques fongiques dans le bois.

Mes premiers travaux, en partenariat avec l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et le Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier (LSTM), ont été présentés lors de l'IRG (The International Research Group on wood preservation) en 1998 à Maastricht « *Characterization of tropical wood-decaying fungi by RFLP analysis of PCR amplified rDNA* » (IRG/WP 98 - 10251).

J'ai obtenu en 1998 le diplôme d'Ingénieur en biochimie du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) et en 1999 le Diplôme d'Etudes Scientifiques Spécialisées (DESS) en Cytologie Moléculaire, dans le cadre des formations diplômantes au Cirad.

Cette thèse est composée d'une introduction situant le sujet en définissant les concepts et les problèmes abordés, et de quatre chapitres comprenant successivement une revue bibliographique (Chapitre I), une étude de la diversité et de la taxinomie moléculaire des champignons dégradant le bois (Chapitre II), une étude phylogénétique de ces champignons (Chapitre III) et la mise au point d'une méthode d'identification à la fois précise et précoce d'un champignon infestant un bois avant qu'il n'est atteint un stade avancé de développement (Chapitre IV). En conclusion, nous insisterons particulièrement sur les perspectives fondamentales et appliquées offertes par tous ces outils de caractérisation moléculaire dont pourraient bénéficier l'ensemble des industries du bois.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a pu être réalisée grâce au soutien du CIRAD qui a mis en place un Plan de Développement Pluriannuel pour tous mes travaux de Recherche. Je remercie tout le personnel du CIRAD.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier (LSTM) qui est une unité mixte de recherche (UMR 113) Agrom/INRA/CIRAD/IRD/UM2. Je remercie Monsieur Bernard Dreyfus, Directeur de ce laboratoire et Directeur de Recherche à l'IRD, qui m'a accueillie dans son unité. Ses grandes compétences, son soutien moral, son profond humanisme et sa simplicité m'ont été très bénéfiques.

Je remercie Christian Sales, Directeur du Programme Bois du CIRAD-Forêt, pour l'appui qu'il m'a toujours assuré et pour la confiance accordée depuis les tâtonnements des premiers instants jusqu'aux dernières mises au point.

Je remercie Daniel Fouquet pour l'aide accordée et pour l'octroi de liberté de manœuvre qui m'étaient indispensables afin de mener à bien mon projet.

Je remercie particulièrement Marc Ducouso qui a accepté de suivre et diriger ce travail. Sa disponibilité, son souci du travail bien fait, sa rigueur scientifique, ses suggestions m'ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération.

Je remercie vivement Hélène Joly pour ses compétences et ses conseils pratiques qui ont su recentrer mes réflexions vers l'essentiel.

Je remercie Monsieur Jean Luc Clément, qui me fait l'honneur d'être le directeur de cette thèse.

Je suis aussi sensible à l'honneur que me font Madame Catherine Massiani, Messieurs Marcel Asther, Philippe Gérardin, Edmond Wozniak d'être membres de ce jury de thèse.

Toute ma sympathie à Yves Prin qui a aussi contribué à la réalisation de ce travail. Ses conseils scientifiques et surtout sa gentillesse m'ont été d'un grand soutien.

J'exprime toute ma reconnaissance à Clémence Chaintreuil, Odile Domergue, Joël Fardoux, pour l'efficacité de leurs conseils et de leur appui technique.

Je remercie également Xavier Bailly, Gilles Bena, pour leurs conseils phylogénétiques.

Sincères remerciements à Nathalie Pujet pour sa bonne humeur et sa grande disponibilité.

Que tous ceux, qui m'ont apporté leur soutien, sous une forme ou sous une autre, trouvent ici mes chaleureux remerciements.

# SOMMAIRE

<b>Résumé – Abstract</b>	2
<b>Avant-propos</b>	3
<b>Remerciements</b>	4
<b>Liste des figures</b>	9
<b>Liste des tableaux</b>	10
<b>Index des taxons cités dans le texte</b>	11
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	14
<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	19
<b>I.1- Le bois</b>	19
I.1.1- Les différents constituants de la paroi	19
I.1.1.1- La cellulose	20
I.1.1.2- Les hémicelluloses	21
I.1.1.3- Les pectines	21
I.1.1.4- Les lignines	21
I.1.1.5- L'eau contenue dans le bois	22
I.1.2- Organisation de la paroi du bois	22
I.1.2.1- La paroi primaire	23
I.1.2.2- La paroi secondaire	23
I.1.3- Structure générale du bois et des parois cellulaires	24
I.1.4- Vulnérabilité et résistance des bois aux champignons	25
I.1.4.1- Facteurs influant sur la résistance et la vulnérabilité des bois	25
I.1.4.1.1- Influence de la composition chimique du bois	25
I.1.4.1.2- Influence des propriétés physiques du bois	26
I.1.4.1.3- Influence du taux d'hydratation et d'aération des bois	26
I.1.4.1.4- Influence des facteurs extrinsèques d'ordre climatique	26
I.1.4.2- Echelle ou classes de durabilité naturelle	26
	28



I.2- Relation entre la composition du bois et sa sensibilité aux altérations biologiques	
I.2.1- Propagation des champignons et progression des altérations	28
I.2.2- Modes d'action des champignons	29
I.2.3- Les enzymes impliquées dans la dégradation des lignines, de la cellulose et des hémicelluloses	32
I.2.3.1- Les enzymes impliquées dans la dégradation des lignines	33
I.2.3.2- Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose	37
I.3.- Caractères biologiques, reproductifs, systématiques, évolutifs et taxonomiques des champignons	38
I.3.1- Le cycle biologique	39
I.3.2- Les systèmes d'incompatibilité chez les Basidiomycètes	42
I.3.3- Place des Basidiomycètes lignivores dans la classification	43
I.4- Espèce, phylogénie et évolution	46
I.4.1- L'idée de l'évolution	47
I.4.2- La notion d'espèce	47
I.4.2.1- Les premières classifications et définitions de l'espèce	48
I.4.2.2- La définition biologique de l'espèce	49
I.4.2.3- Analyse des critères des définitions de l'espèce	49
I.4.2.4- Les autres définitions de l'espèce	49
I.4.3- La notion d'espèce chez les Basidiomycètes	51
I.5- Méthodes de caractérisation taxonomique applicables aux Basidiomycètes	51
I.5.1- Caractérisation morphologique et anatomique	52
I.5.2- Caractérisation et identification par électrophorèse des protéines ou des isoenzymes	52
I.5.3- Limite du système d'incompatibilité	52
I.5.4- Caractérisation et identification immunologique	53
I.5.5- Caractérisation et identification moléculaire	53
I.6- Conclusion	56
 <b>CHAPITRE II : DIVERSITÉ DES APHYLLOPHORALES DÉGRADANT LE BOIS EN POURRITURE CUBIQUE ET FIBREUSE.</b>	 57
II.1. Introduction	57
II.2. Matériel et méthodes	58
II.2.1. Collection de souches du CIRAD	58
II.2.2. Matériel biologique	59
II.2.3. Production de mycélium	61
II.2.4. Etudes moléculaires	62
II.2.4.1. Extraction de l'ADN total	62
II.2.4.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	63
II.2.4.2.1. Principe	63
II.2.4.2.2. Application aux ITS	63
II.2.4.2.3. Purification sur gel des fragments d'ADN	64

II.2.4.3. Le polymorphisme de restriction (RFLP)	65
II.2.4.4. Le séquençage	66
II.2.4.4.1. Principe	66
II.2.4.4.2. La réaction de séquence	66
II.2.4.4.3. Purification des produits des réactions de séquence et séquençage	67
II.2.4.4.4. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données - <i>BLAST</i>	68
II.3. Résultats	70
II.3.1. Amplification des ITS et analyse du polymorphisme de restriction - <i>RFLP</i>	70
II.3.2. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données - <i>BLAST</i>	74
II.4. Discussion	79
II.4.1- Analyse du polymorphisme de restriction (RFLP) des ITS et de la taille des ITS	79
II.4.2- Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données ( <i>BLAST</i> )	81
II.5. Conclusion	82
<b>CHAPITRE III : ÉTUDE DES RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES CHEZ LES CHAMPIGNONS DE POURRITURES CUBIQUE ET FIBREUSE.</b>	84
III.1- Introduction	84
III.2- Matériel et méthodes	90
III.2.1. Matériel biologique	90
III.2.2. Méthodes phylogénétiques	92
III.2.2.1. Phylogénie de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S de l'ensemble des champignons étudiés	93
III.2.2.2. Reconstruction des arbres phylogénétiques de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S en ajoutant les ITS1 et ITS2 pour les genres : <i>Spongipellis</i> , <i>Gloeophyllum</i> et <i>Trametes</i> .	93
III.3. Résultats	94
III.3.1. Analyse et alignement des séquences : Arbre 5,8S, Figure III.1.	94
III.3.2. Analyse et alignement des séquences pour les genres <i>Spongipellis</i> , <i>Gloeophyllum</i> et <i>Trametes</i>	94
III.4- Discussion	102
III.5- Conclusions	106
	108

## **CHAPITRE IV : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION PRÉCOCE *IN SITU* DE CHAMPIGNONS DU BOIS**

IV.1. Introduction	108
IV.2. Détection moléculaire <i>in situ</i> de Basidiomycètes de pourriture blanche et de pourriture brune infectant des bois tempérés et tropicaux.	109
« <i>In situ</i> molecular detection of white-rot and brown-rot Basidiomycetes infecting temperate and tropical woods » publication en cours d'examen dans Canadian Journal of Forest Research (acceptée le 8 juillet 2004).	109
IV.3- Conclusions et perspectives	119
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	121
 Annexe 1 : Quelques exemples d'arbres attaqués par des champignons lignivore Basidiomycètes.	125
 Annexe 2 : Réactifs utilisés	127
 <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	129



## Liste des figures

- Figure I.1 : Représentation schématique des étapes de l'assemblage de la cellulose native.
- Figure I.2 : Représentation schématique de la structure des trois alcools cinnamyliques (monolignols), précurseurs des trois unités de la lignine.
- Figure I.3 : Schéma de l'organisation tridimensionnelle d'une fibre de bois de l'échelle ultrafine à l'échelle macroscopique.
- Figure I.4 : Représentation schématique de la constitution macroscopique du bois.
- Figure I.5 : *Trametes versicolor* envahissant des cellules d'aubier de hêtre.
- Figure I.6 : Traverse du métro de Caracas (Venezuela) attaquée par un champignon de pourriture fibreuse.
- Figure I.7 : Fragment de bois indéterminé attaqué par un champignon de pourriture cubique.
- Figure I.8 : Cycle catalytique de la lignine peroxydase (LiP) d'après Labat et Meunier (1990).
- Figure I.9 : Cycle catalytique de la manganèse peroxydase (MnP) d'après Labat et Meunier (1990).
- Figure I.10 : Mécanisme d'action de la Laccase (Lac) d'après Higuchi (1989).
- Figure I.11 : Principales étapes du cycle biologique des Basidiomycètes
- Figure I.12 : Principales étapes de la croissance végétative des Basidiomycètes à l'état dicaryotique.
- Figure II.1 : Vue partielle de la collection de souches (Aphylllophorales) du laboratoire de préservation des bois du Cirad
- Figure II.2 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de PCR appliqué à l'amplification des ITS de champignons.
- Figure II.3 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de réaction de séquences des ITS de champignons.
- Figure III.1 : Arbre phylogénétique de Basidiomycètes dégradant le bois, basé sur la comparaison des séquences ADN<sub>r</sub> de la région 5,8S obtenu par la méthode du Neighbor-Joining.
- Figure III.2 : Position phylogénétique des espèces du genre *Spongipellis* basée sur la comparaison des séquences d'ADN<sub>r</sub> : ITS1, 5,8S et ITS 2.
- Figure III.3 : Position phylogénétique des espèces du genre *Gloeophyllum* basée sur la comparaison des séquences d'ADN<sub>r</sub> : ITS1, 5,8S et ITS 2.
- Figure III.4 : Position phylogénétique d'espèces du genre *Trametes* basée sur la comparaison des séquences d'ADN<sub>r</sub> : ITS1, 5,8S et ITS 2.

## Liste des tableaux

Tableau I.1 : Classes de durabilité naturelle du bois vis-à-vis des champignons lignivores, définies selon la norme EN 350-1.

Tableau II.2 : Numéro de référence de la souche, espèce, nombre de paires de bases des ITS amplifiés (88 souches) et sommes des nombres de paires de bases des fragments obtenus pour chaque souche avec les enzymes de restriction TaqI, Sau96A et AluI.

Tableau II.3 : Liste des 53 souches séquencées et leur numéro de référence

Tableau II.4 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

Tableau II.5 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

Tableau II.6 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné un genre différent.

Tableau III.1 : Grandes étapes de l'Histoire évolutive des Basidiomycètes. (\*) Indique les datations estimées avec la méthode de l'horloge moléculaire à partir du taux de substitution des nucléotides (Cairney, 2000).

Tableau III.2 : Liste des 57 Basidiomycètes étudiés avec leur numéro de référence et des séquences de référence avec leur numéro d'accèsion.

Table 1: Characteristics of the fungal strains (Basidiomycetes) and wood samples used in this study

Table 2: Lengths (in bp) of pure fungal strain sequences, weight loss (mean  $\pm$  standard deviation) and DNA sequence homology expressed in number of common bases when comparing sequences obtained from infected wood fungal DNA and sequences from the pure fungal strain.

## Index des taxons cités dans le texte

### FUNGI

#### Basidiomycètes

*Abortiporus biennis* (Bull.) Singer

*Amanita* Adans

*Amylostereum areolatum* (Chaillet) Boidin

*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.

*Armillariella ostoyae* Romagn.

*Antrodia carbonica* (Overh.) Ryvarden & Gilb.

*Antrodia serialis* (Fr.) Donk

*Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst

*Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill

*Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden

*Climacocystis borealis* (Fr.) Kotl. & Pouzar

*Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst.

*Coprinus* Pers.

*Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt.

*Donkioporia expansa* (Desm.) Kotl. & Pouzar

*Favolus alveolarius* Quél.

*Favolus mori* (Pollini) Fr.

*Fibroporia vaillantii* (DC.) Parmasto synonyme : *Antrodia vaillantii* (DC.) Ryvarden ;

*Fistulina hepatica* (Schaeff.) With.

*Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden

*Fomes fomentarius* (L.) Kickx

*Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer

*Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.

*Ganoderma adpersum* (Schulzer) Donk

*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.

*Ganoderma resinaceum* Boud.

*Ganoderma* P. Karst.

*Gloeophyllum abietinum* (Bull.) P. Karst.

*Gloeophyllum odoratum* (Wulfen) Imazeki

*Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen) P. Karst.

*Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill

*Hericium coralloides* (Scop.) Pers.

*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.

*Hexagonia hydnoides* (Schwartz) M. Fidalgo

*Hexagonia nitida* Durieu & Mont.

*Hymenochaete tabacina* (Sowerby) Lev.

*Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst.

*Irpex flavus* Kalchbr.

*Laccaria laccata* (Scop.) Fr.

*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Bondartsev & Singer

*Lentinus lepideus* (Fr.) Fr.

*Lenzites betulina* (L.) Fr.

*Leucosporidium* Fell, Statzell, Hunter & Phaff

*Meripilus giganteus* (Pers.) P. Karst.

*Merulius tremellosus* Schrad.

*Oligoporus caesius* (Schrad.) Gilb. & Ryvarde  
*Oligoporus stipticus* (Pers.) Gilb. & Ryvarde  
*Oxyporus latemarginatus* (Durieu & Mont.) Donk  
*Oxyporus* (Bourdot & Galzin) Donk  
*Perenniporia fraxinea* (Bull.) Ryvarde  
*Perenniporia medullopanis* (Jacq.) Donk  
*Perenniporia subacida* (Peck) Donk  
*Phanerochaete chrysosporium* Burds.  
*Phellinus ferreus* (Pers.) Bourdot & Galzin  
*Phellinus nigricans* (Fr.) P. Karst.  
*Phellinus nigrolimitatus* f. *longitubulatus* Murashk.  
*Phellinus pini* (Thore) Fr.  
*Phellinus pomaceus* (Pers.) Maire  
*Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin  
*Phlebia radiata* Fr.  
*Phlebiopsis roumeguerei* (Bres.) Jülich & Stalpers  
*Pleurotus* (Fr.) P. Kumm.  
*Podoscypha bolleana* (Mont.) Boidin  
*Podoscypha petalodes* (Berk.) Boidin  
*Podoscypha ursina* Boidin & Berthet  
*Polyporus melanopus* (Pers.) Fr.  
*Polyporus ostreiformis* Berk..  
*Poria carbonica* Overh.  
*Poria monticola* Murrill.  
*Poria placenta* (Fr.) Cooke  
*Postia placenta* (Fr.) Larsen & Lombard  
*Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill  
*Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarde  
*Rigidoporus ulmarius* (Sowerby) Imazeki  
*Serpula incrassata* (Berk. & Curtis) Donk  
*Serpula himantoides* (Fr.) P. Karst.  
*Serpula lacrymans* (Wulfen) Schröt.  
*Spongipellis spumeus* (Sowerby) Pat.  
*Stereum rugosum* (Pers.) Fr.  
*Stereum sanguinolentum* (Alb. & Schwein.) Fr.  
*Suillus granulatus* (L.) Snell  
*Trametes odorata* (Wulfen) Fr.  
*Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat  
*Trametes versicolor* (L.) Lloyd  
*Trametes zonata* Wettst.  
*Xylobolus frustulatus* (Pers.) Boidin

#### Ascomycètes

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.  
*Aspergillus* Link  
*Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi.  
*Ceratocystis pinicola* Harr. & Wingf.  
*Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau (1952), (= *Ophiostoma ulmi*).  
*Engyodontium album* (Limber) de Hoog  
*Fusarium napiforme* Marasas, Nelson & Rabie  
*Fusarium* Link  
*Gibberella sacchari* Speg.

*Orbilia luteorubella* (Nyl.) P. Karst.  
*Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf.  
*Penicillium* Link  
*Pullularia pullulans* var. *fusca* (Browne) Berkhout.  
*Trichoderma atroviride* Bissett  
*Verticillium lamellicola* (F.E.V. Sm.) W. Gams

Oomycètes  
*Pythium* Pringsh.

Zygomycètes  
*Rhizopus* Ehrenb.  
*Mucor* Fresen.

Glomeromycètes  
*Glomus* Tul. & Tul.  
*Paraglomus* Morton & Redecker  
*Archaeospora* Morton & Redecker  
*Acaulospora* Gerd. & Trappe

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Depuis les temps les plus reculés, le bois constitue un élément essentiel de la vie de l'Homme. La massue est le premier objet qu'il utilise pour se défendre contre les bêtes féroces et pour chasser. Un tronc d'arbre lui procure un moyen de naviguer sur les fleuves. La hutte est pour lui un refuge confortable et les constructions sur pilotis lui permettent de vivre sur l'eau, à l'abri des fauves et des tribus ennemies tout en tirant de la pêche sa subsistance. Le bois lui fournit une partie des outils dont il se sert quotidiennement (bêches, pioches, pelles, cannes à pêche,...), les ustensiles de cuisine, les objets de toilette (peignes, épingles,...), les armes rudimentaires. Les feuilles et l'écorce des arbres lui procurent aussi des vêtements. Par la suite, l'importance de ce matériau sera traduit dans les textes législatifs ainsi, en France un capitulaire de l'an 800, soucieux d'établir un juste équilibre entre les ressources du territoire, prescrit aux intendants des domaines royaux de défricher les cantons propres à l'agriculture, mais de ménager soigneusement ceux qui doivent rester en forêts ; le bois devient alors le matériau par excellence et les gouvernements se montreront toujours soucieux de la production de bois, ce qui les amènera à poser les bases de la sylviculture et de la gestion raisonnée des forêts.

Même si l'ère industrielle du siècle dernier a profondément infléchi la vocation de la forêt, le bois reste toujours un matériau de premier plan, souvent irremplaçable, présentant de nombreuses qualités : résistance mécanique, flexibilité, résilience, facilité d'usinage et malléabilité. Très varié en couleur, en aspect, au toucher, ses utilisations à tant d'usages différents sont rendues possibles grâce à un choix d'essences variées possédant chacune des caractéristiques différentes.

Encore aujourd'hui, les exemples foisonnent de bâtiments, meubles, outils, œuvres d'art, *etc.* où il est associé à de multiples autres matériaux. Remis à l'honneur dans de prestigieux bâtiments publics comme la Bibliothèque François Mitterrand (réalisée pour partie en Ipé *Tabebuia* spp.), il peut structurer le bâti sous la forme de charpente, solives, poutres mais également participer à l'agrément de vie sous forme de parquets, lambris, menuiseries, mobilier et décorations diverses.

Mais son caractère naturel, sa structure complexe, et sa composition organique, en font un matériau périssable, ce qui limite ses utilisations à très long terme sans traitement spécifique. De nombreux éléments influencent la conservation du bois ; elle dépend non seulement des caractéristiques intrinsèques liées aux qualités propres du bois, telles que son humidité et sa

durabilité naturelle, mais aussi d'éléments extrinsèques se rapportant aux conditions ambiantes dans lesquelles il est utilisé. Ce sont précisément ces conditions ambiantes qui définissent les niveaux de risque à l'emploi. Parmi ces éléments extrinsèques, se trouvent les agents biotiques de dégradation, en particulier, les bactéries, les champignons, les insectes, les crustacés et les mollusques. Parmi ces organismes, les champignons provoquent des dégâts considérables sur les bois (Fougerousse, 1979) en dégradant des chaînes de cellulose en unités de glucose directement assimilables par le micro-organisme.

Le rôle des champignons dans les écosystèmes naturels et dans les équilibres biologiques est considérable. Avec les bactéries, les champignons saprophytes sont les principaux "recycleurs" des peuplements végétaux. Ils débarrassent le sous-bois de l'épais tapis de feuilles mortes, de brindilles et de cadavres divers qui s'accumulent chaque année. Ils transforment la litière en humus et participent à son incorporation dans le sol.

En tant qu'accumulateurs de certains polluants comme les métaux lourds (plomb, mercure, cadmium) et les éléments radioactifs, les champignons constituent des témoins efficaces de l'état sanitaire de leur biotope. La sensibilité des champignons aux pluies acides comme à certains traitements chimiques du sol (engrais, pesticides, *etc.*) fait que leur régression peut être un signal d'alarme pour l'avenir ; la forêt est dans son ensemble directement menacée en même temps qu'eux. La préservation des champignons semble indispensable au maintien et à l'équilibre des écosystèmes. Les premiers cris d'alarme relatifs à leur protection datent des années 1960. Les différents ministères européens de l'Environnement et les organismes internationaux, en particulier l'*European Council for the Conservation of Fungi* (ECCF) créé en 1985, développent des actions de protection et ont en charge l'élaboration d'une liste rouge des espèces de champignons menacées en Europe.

Parmi les champignons, ceux qui s'attaquent au bois le font en dégradant soit la lignine soit la cellulose ou les deux à la fois et sont nommés lignivores du latin « *lignum* », bois. Ces champignons peuvent être spécialisés plus particulièrement dans la destruction de la cellulose ou dans la dégradation de la lignine en étant assujettis, soit à des espèces résineuses, soit à des espèces feuillues, voire aux deux à la fois. Ces champignons appartiennent à deux grands groupes, selon leur spécificité à dégrader le bois : un groupe qui engendre une pourriture colorée ou cubique et un autre groupe qui engendre une pourriture blanche ou fibreuse. Les agents de pourritures cubiques telles que *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Antrodia serialis* sont destructeurs de la cellulose mais peu dommageables pour la lignine, ce qui entraîne une coloration plus foncée du bois (Liese, 1975 ; Dirol, 1976 ; Eriksson *et al.*, 1990 ; Blanchette *et al.*, 1990).



Le processus de dégradation du bois des pourritures fibreuses telles que *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma applanatum*, *G. resinaceum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Spongipellis spumeus* est plus complexe car tous les constituants des membranes ligneuses peuvent être détruits (Liese, 1975 ; Dirol, 1976 ; Eriksson *et al.*, 1990 ; Blanchette *et al.*, 1990). Souvent ce processus de dégradation débute par la dégradation de la lignine et se poursuit par la dégradation de tous les constituants du bois dans un ordre variable suivant les champignons.

Dans le cadre de l'utilisation du bois comme matériau, ces champignons provoquent une dépréciation rapide de sa qualité, donc de sa valeur marchande qu'il s'agisse d'arbres abattus ou des produits industriels qui en découlent. C'est pourquoi une intervention rapide et efficace pour accroître la durabilité naturelle d'un bois, permettra une optimisation de l'utilisation des fongicides destinés au traitement. Actuellement, la méthode la plus classique de protection du bois contre les champignons lignivores est le traitement par des produits chimiques à large spectre fongicide, lesquels s'avèrent efficaces, mais polluants pour l'environnement.

Afin de promouvoir l'emploi du matériau bois dans les situations les plus diversifiées, il est nécessaire de déterminer l'exacte quantité du fongicide requis pour une préservation du bois efficace et respectueuse de la santé et de l'environnement. C'est pourquoi une meilleure connaissance des agents susceptibles de provoquer l'altération et une identification plus rapide des agents conditionnera l'efficacité du traitement. Cette identification des agents infectants est possible par la détermination d'un certain nombre de caractères qui lui sont spécifiques tels que les caractères morphologiques, anatomiques, les caractères immunologiques et génétiques (analyse des protéines, des enzymes et de l'ADN) et les systèmes d'incompatibilité sexuelle et végétative.

Cette caractérisation peut se faire de différentes façons, méthodes descriptives, méthodes analytiques, par systèmes d'incompatibilité sexuelle et végétative. Ces outils de caractérisation varient par leur efficacité, leur sensibilité et leur rapidité de mise en œuvre (Zakia *et al.*, 2004).

Les méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques et anatomiques des champignons demeurent incontournables. Cependant, elles possèdent des limites pour la caractérisation et l'identification de ces champignons, au niveau inter et intraspécifique. Elles restent fastidieuses et le plus souvent ne permettent pas l'identification des cultures mycéliennes.

Il apparaît indispensable de proposer de nouvelles alternatives pour l'identification des champignons dégradant le bois. Les nouvelles techniques moléculaires combinant amplification et séquençage semblent particulièrement adaptées. Dans cette étude les outils

moléculaires comme la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR), le polymorphisme de restriction (RFLP) mises au point chez les champignons par Bruns *et al.* (1991) et les outils faisant appel à des séquenceurs automatiques rapides (Lane *et al.*, 1985) vont permettre une caractérisation suffisante pour reconnaître avec certitude un taxon fongique en utilisant quelques milligrammes de mycélium végétatif frais (Rogers *et al.*, 1989 ; White *et al.*, 1990 ; Bruns *et al.*, 1991 ; Henrion *et al.*, 1992 ; Erland *et al.*, 1994).

L'identification sera réalisée en comparant la séquence de la souche de champignon à identifier aux séquences de la banque GENBANK ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)) tout en intégrant les différents outils et programmes de phylogénie (calcul du pourcentage de similitude, calcul des matrices de distances phylogénétiques, positionnement dans l'arbre phylogénétique incluant toutes les séquences y compris des séquences de référence de GENBANK). Dans ce cadre d'application, les banques de séquences sont un élément essentiel de la caractérisation taxonomique.

L'objectif général de ce travail est de préciser l'identification des principaux groupes de champignons en particulier les Aphyllophorales, décomposeurs du bois, en développant et en validant les différents outils moléculaires tels que les données de PCR/RFLP, les marqueurs neutres hautement polymorphes (ITS) et les données de séquences. De plus, ces recherches visent aussi à la reconnaissance d'une espèce fongique sans critère morphologique, c'est-à-dire au premier stade de l'infestation du bois.

Dans ce document, après une revue bibliographique présentée dans le Chapitre I visant à une meilleure connaissance du bois en tant que substrat et des champignons qui le dégradent, trois thèmes de recherche seront développés :

- Tout d'abord, une recherche destinée à préciser et fiabiliser la caractérisation et l'identification des champignons. Ce travail, effectué sur des souches disponibles au CIRAD devra permettre une meilleure connaissance de la diversité des champignons dégradant le bois en pourriture cubique et en pourriture fibreuse. Si l'approche anatomo-morphologique classique est toujours nécessaire pour les identifications, les méthodes moléculaires ont permis de considérablement progresser dans ce domaine ; des outils moléculaires comme la PCR/RFLP et le séquençage seront donc utilisés pour réaliser les caractérisations des espèces et établir leur positionnement taxonomique.

- Puis, une recherche sur les relations phylogénétiques chez les champignons de pourriture cubique et fibreuse. Cette étude phylogénétique a été conçue pour tenter de répondre à deux questions :

- 1- Y a-t-il un regroupement des espèces en fonction de leur capacité fonctionnelle à dégrader le bois en pourriture cubique et/ou en pourriture fibreuse ?
  - 2- Comment les phylogénies nous renseignent-elles sur les histoires évolutives et la spéciation de ces champignons ?
- Enfin, la mise au point d'une méthode d'identification à la fois précise et précoce d'un champignon infestant un bois réalisée avec trois souches de champignons de pourriture cubique et deux souches de champignons de pourriture fibreuse, et cinq bois différents provenant de zone tropicale et tempérée. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication au Canadian Journal of Forest Research "*In situ* molecular detection of white-rot and brown-rot Basidiomycetes infecting temperate and tropical woods". En effet, un test précoce et sensible permettrait d'appliquer judicieusement les traitements chimiques nécessaires les mieux adaptés.

En conclusion, nous insisterons particulièrement sur les perspectives fondamentales et appliquées offertes par tous ces outils de caractérisation moléculaire dont pourraient bénéficier l'ensemble des industries du bois.

# **CHAPITRE I**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **CHAPITRE I : Revue bibliographique**

Connu depuis des millénaires, le bois est sans conteste le matériau de construction le plus étonnant qu'ait découvert l'homme. Toutefois des organismes vivants comme les champignons, en particulier les Basidiomycètes sont capables de le détruire dans certaines circonstances (Déon, 1986). Comme tous les champignons, les Basidiomycètes sont incapables de fabriquer leurs propres hydrates de carbone à partir du gaz carbonique de l'air parce qu'ils sont dépourvus de pigments chlorophylliens. Leur métabolisme est entièrement tributaire des matières organiques existantes, vivantes ou inertes, tel le bois, qu'ils digèrent partiellement ou totalement, lentement ou rapidement, en fonction de leur arsenal enzymatique et des conditions climatiques (Blanchette *et al.*, 1990). Cette dégradation de la matière ligneuse, encore appelée « pourriture », correspond à une détérioration profonde et irréversible par hydrolyse enzymatique, affectant les caractéristiques chimiques, physiques, mécaniques et esthétiques du bois (Déon, 1986).

Dans ce chapitre, plusieurs points essentiels vont être présentés visant à une meilleure connaissance des champignons qui dégradent les bois. Dans un premier temps, nous nous intéresserons au bois, source de carbone des champignons. Dans un deuxième temps notre réflexion portera sur la relation entre la composition du bois et sa sensibilité aux altérations biologiques ; dans cette partie, nous développerons successivement la propagation des champignons, leur mode d'action et les enzymes impliquées dans les dégradations de la lignine et de la cellulose. Dans un troisième temps, nous exposerons les caractères généraux des champignons à travers notamment le cycle biologique, les systèmes d'incompatibilité et la place des Basidiomycètes lignivores dans la classification. Dans un quatrième temps, nous aborderons la notion d'espèce, de phylogénie et d'évolution chez les Basidiomycètes. Enfin, nous détaillerons quelques méthodes de caractérisation taxonomique applicables aux Basidiomycètes notamment des méthodes de caractérisation moléculaire.

### **I.1. Le bois**

#### **I.1.1. Les différents constituants du bois**

Les composants majoritaires du bois sont trois polymères: la cellulose qui représente 40 à 55 % de la masse totale des parois cellulaires, les hémicelluloses 25 à 40 % et la lignine 18 à 33 % (Eaton et Hale, 1993). Il faut ajouter à ces composants des métabolites secondaires (de 1 à 5 % du bois habituellement mais jusqu'à 10 à 40 % dans certains cas). Dans ces métabolites secondaires se trouvent en particulier des terpènes, des tannins, des lignanes, des stilbènes et des acides aliphatiques. La présence de ces composés dans le duramen implique une durabilité naturelle plus ou moins importante du bois (Jacquot, 1974 ; Fougrouse, 1979). Des



substances minérales sont aussi présentes dans les cellules du bois telles que le calcium, le potassium, le magnésium et la silice, mais excèdent rarement 1%. Certaines substances de réserves issues de l'activité photosynthétique, telle que l'amidon peuvent être également présentes et se révéler attractives pour les organismes colonisateurs du bois (Déon, 1986).

### I.1.1.1. La cellulose

La cellulose est un homopolysaccharide de la série des  $\beta$ -D-glucanes dont l'unité de base est constituée de cellobiose (deux unités glucose liées en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) avec un angle de rotation de 180°. C'est le principal composant structural des parois végétales (Figure I.1).

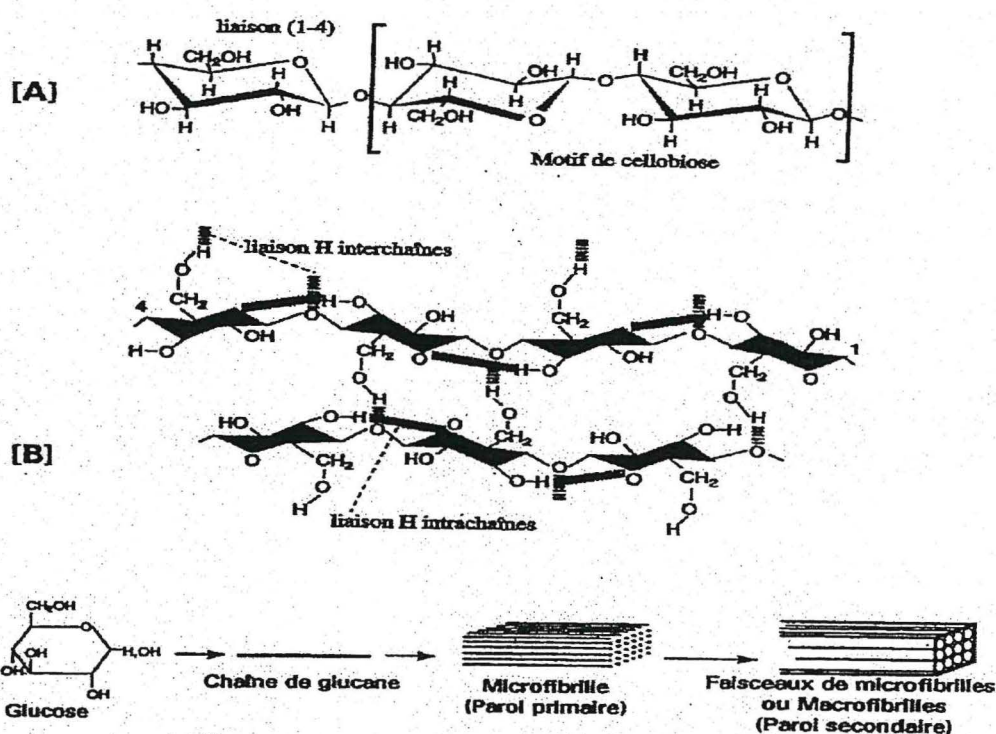


Figure I.1 : Représentation schématique des étapes de l'assemblage de la cellulose native. [A] motif de base cellobiose (Disaccharide  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucose avec un angle de rotation de 180°). [B] mode d'association des chaînes  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucane pour former les microfibrilles.

Le degré de polymérisation de la cellulose dans les parois secondaires est élevé, de l'ordre de 8 000 à 10 000 alors que dans les parois primaires il ne serait que de 2 500 à 4 500 (voire inférieur à 500) (Preston *et al.*, 1948). Les chaînes de cellulose sont associées entre elles pour former les microfibrilles (Preston *et al.*, 1948) dont le diamètre varie selon les espèces végétales (Chanzy, 1990).

Dans la paroi primaire, ces microfibrilles sont formées en général par l'association d'environ 36 chaînes. Dans la paroi secondaire, ces microfibrilles sont souvent associées en faisceaux aussi appelés macrofibrilles, (Robert et Vian, 1994 ; Delmer et Amor, 1995).

#### **I.1.1.2. Les hémicelluloses**

Les hémicelluloses forment un groupe hétérogène de polysaccharides associés de façon non covalente à la cellulose et/ou de manière covalente à la lignine dans les parois végétales. Elles sont principalement constituées de sucres faisant partie d'une série de trois hexoses (glucose, mannose, galactose), deux pentoses (xylose et arabinose) et parfois d'acides uroniques. La chaîne principale comprend généralement des enchaînements par liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) d'un ou deux types de monosaccharides. Selon la nature du squelette, on distingue différents types d'hémicelluloses dont les principales sont des xylanes et les mannanes.

Les hémicelluloses les plus représentées sont les xylanes que l'on trouve en proportions différentes selon l'espèce végétale (Joseleau *et al.*, 1992). Les feuillus contiennent plus d'hémicelluloses que les résineux et leurs compositions diffèrent : le xylose est le plus représenté chez les feuillus et les galactomannanes, enchaînements principaux mixtes de glucose et de mannose, substitué par le galactose, sont plus particulièrement représentés chez les résineux (Joseleau *et al.*, 1992b).

#### **I.1.1.3. Les pectines**

Les deux constituants fondamentaux des pectines sont les acides polygalacturoniques qui forment des homopolymères de résidus acide (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -D-galacturonique (GalA) et les rhamnogalacturonanes de type I qui sont des hétéropolymères dont l'unité répétitive est un disaccharide (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-rhamnostyl – (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -D-GalA (Carpita et Gibeault, 1993). Les chaînes d'acide polygalacturonique peuvent s'associer par l'intermédiaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , formant des structures dites en boîte à œufs (Rees, 1982). Les pectines peuvent également s'associer avec d'autres polysaccharides non cellulosiques par l'intermédiaire de liaisons ester avec les acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique (Fry, 1986). Ce sont les polymères les plus facilement extractibles des parois.

#### **I.1.1.4. Les lignines**

Les lignines sont des polymères aromatiques tridimensionnels de structure moléculaire complexe (Nimz, 1974) dont la diversité vient de ce qu'ils sont constitués de trois types d'unités phénylpropanes liées par des liaisons éthers ou carbone-carbone. Les unités p-hydroxyphényle (H), gaïacyle (G) et syringyle (S) de la lignine proviennent des trois alcools cinnamyliques correspondant, respectivement à l'alcool *p*-coumarylique, à l'alcool coniférylique et à l'alcool sinapylique, aussi nommés monolignols (Figure I.2).

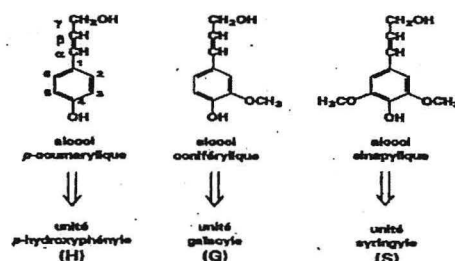


Figure I.2 : Représentation schématique de la structure des trois alcools cinnamyliques (monolignols), précurseurs des trois unités de la lignine

Ces unités diffèrent entre elles par le degré de méthylation du noyau aromatique. Les unités **H** ne sont pas méthoxylées, les unités **G** sont méthoxylées sur le carbone 3 du cycle aromatique et les unités **S** présentent deux résidus méthoxylés en C3 et C5. Durant la polymérisation de la lignine par voie radicalaire, les monomères peuvent être liés entre eux par un grand nombre de liaisons inter-monomères (Freudenberg et Neish, 1968 ; Lewis et Yamamoto, 1990).

Chez les Gymnospermes, la lignine de bois est principalement constituée d'unités **G**. Chez les Angiospermes, les bois de feuillus contiennent une lignine mixte constituée d'unités **G** et **S** (Lange *et al.*, 1995).

#### I.1.1.5. L'eau contenue dans le bois

On distingue deux types d'eau contenue dans le bois (Fengel et Wegener, 1984), l'eau de constitution des molécules ligneuses qui est liée au bois par voie chimique et l'eau d'imprégnation et de capillarité contenue dans les parois cellulaires et les pores du bois qui est liée au bois par voie physique. Cette dernière peut être éliminée en très grande partie par séchage.

#### I.1.2 - Organisation de la paroi du bois

Après avoir présenté les différents constituants de la paroi du bois, l'organisation des différents composés du bois va être présentée dans ce paragraphe.

Les composés chimiques du bois ne sont pas indépendants les uns des autres, mais s'organisent de manière plus ou moins complexe au niveau des parois cellulaires (Figure I.3). Le bois est constitué de cellules distinctes séparées par une lamelle moyenne essentiellement pectique



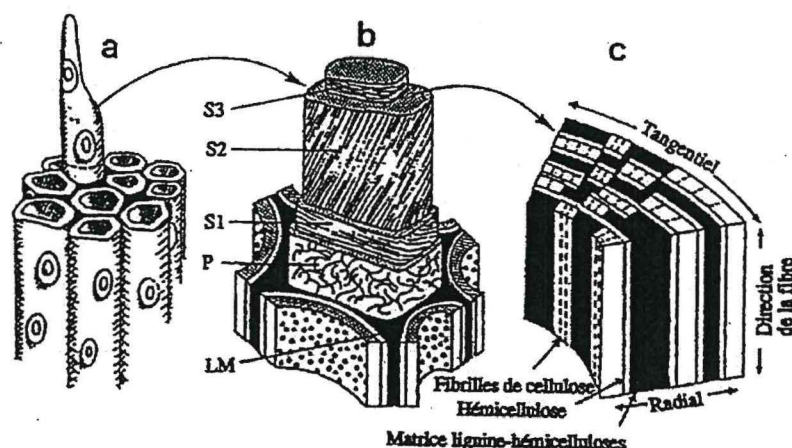


Figure I.3 : Schéma de l'organisation tridimensionnelle d'une fibre de bois de l'échelle ultrafine à l'échelle macroscopique. (a) Faisceau de fibres du bois ; (b) Vue schématisée tridimensionnelle des différentes couches d'une fibre ; (c) Relation ultrastructurale entre hémicelluloses, lignine et cellulose, d'après Kerr et Goring (1975).

LM : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : couches externe, médiane et interne de la paroi secondaire.

#### I.1.2.1. La paroi primaire

La paroi primaire est formée en premier au cours du développement cellulaire. Elle est constituée de microfibrilles de celluloses enrobées dans une matrice amorphe de pectines, d'hémicelluloses et de protéines puis lorsqu'elle a atteint sa taille définitive, elle se lignifie pour contenir jusqu'à 50 % de lignine, la proportion de cellulose devenant alors très limitée (Meier, 1964).

#### I.1.2.2. La paroi secondaire

La paroi secondaire est synthétisée à la fin de la phase d'élongation cellulaire par apposition de matériel d'origine cytoplasmique. La paroi secondaire représente la plus grande part de la paroi végétale mature. Elle est constituée de 15 à 30 % de lignine, de cellulose et d'hémicelluloses en proportions sensiblement égales (Meier, 1964). La lignine se dépose sur le réseau polysaccharidique (Siegel, 1957) en trois couches (S1, S2, S3) se distinguant essentiellement par l'orientation des microfibrilles de cellulose cristalline.

La fine couche S1 (environ 1  $\mu\text{m}$ ) est constituée de plusieurs lamelles comportant des microfibrilles de celluloses présentant une inclinaison d'environ 90° par rapport à l'axe longitudinal.

La couche médiane S2 est la plus épaisse (1 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Elle est généralement formée de plusieurs lamelles comportant des microfibrilles de cellulose qui sont le plus souvent parallèles à l'axe longitudinal de la paroi.

La couche S3 est fine (environ 1  $\mu\text{m}$ ) et ses microfibrilles de cellulose ont la même orientation que celles de la couche S1 mais elles présentent un degré de parallélisme entre-elles plus faible.

Au cours de la formation et de la lignification de la paroi secondaire, des ponctuations se différencient. Ce sont des zones d'interruption de cette paroi qui permettent le passage des fluides (Meier, 1964).

### I.1.3. Structure générale du bois et des parois cellulaires

Au cours de la croissance secondaire, l'assise génératrice libéro-ligneuse (méristème secondaire) élabore du côté de la moelle, de manière centrifuge, les cellules du xylème secondaire ou bois où circulent la sève brute et, du côté de l'écorce, de manière centripète, les cellules du phloème secondaire ou liber où circule la sève élaborée constituée des polymères du glucose, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Figure I.4, Fengel et Wegener, 1984).

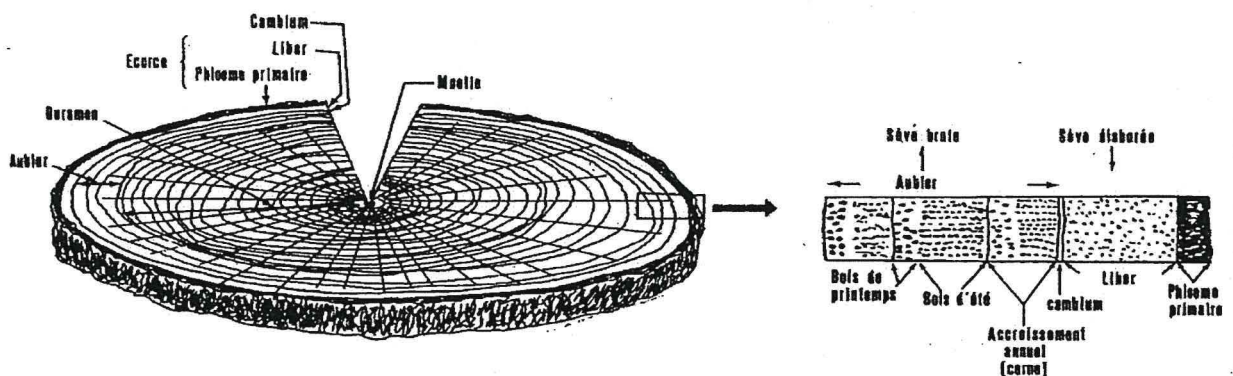


Figure I.4 : Représentation schématique de la constitution macroscopique du bois

L'aubier (bois le plus jeune) se juxtapose au cambium. La différenciation des éléments secondaires à partir du cambium après maturation des cellules conduit à la formation d'un tissu vivant, le parenchyme, qui joue un rôle dans l'élaboration des substances complexes et dans la mise en réserve de l'amidon. L'aubier est physiologiquement actif, il est perméable aux substances, peu dense, peu résistant aux champignons et aux insectes xylophages.

Le bois parfait (bois de cœur ou duramen) qui a un rôle de soutien est issu du parenchyme en voie de disparition et est constitué essentiellement de lignines et de diverses substances (tanins, résines, sels d'acides organiques) qui confèrent à chaque espèce une durabilité naturelle spécifique variable.

Quelle que soit l'espèce ligneuse, la paroi cellulaire de fibres et de trachéides est constituée de quatre couches concentriques différentes formant les parois primaire et secondaire qui comprennent trois sous couches : S1, S2 et S3 (Fengel et Wegener, 1984).

Les espèces ligneuses se répartissent en deux groupes principaux, à savoir : les Angiospermes qui comprennent les espèces feuillues et les Gymnospermes qui regroupent principalement les espèces résineuses.

La structure ligneuse des espèces résineuses est simplifiée et comporte les trachéides, le parenchyme axial, les rayons ligneux, les cellules sécrétrices et les canaux résinifères.

La structure ligneuse des espèces feuillues est plus élaborée et se compose de fibres, vaisseaux, parenchyme axial, rayons ligneux, cellules et canaux oléorésineux (Fengel et Wegener, 1984).

#### **I.1.4. Vulnérabilité et résistance des bois aux champignons**

Le bois par son caractère naturel, sa structure complexe et sa composition organique est un matériau périssable, ce qui limite ses utilisations à long terme. De nombreux éléments peuvent influencer la conservation du bois et d'une manière générale, la conservation du bois dépend non seulement des caractéristiques intrinsèques liées à sa qualité propre, telles que son humidité et sa durabilité naturelle, mais aussi d'éléments extrinsèques se rapportant aux conditions ambiantes dans lesquelles il est utilisé (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986 ; Zabel et Morell, 1992).

Enfin, il faut aussi tenir compte de l'existence de variations individuelles ; en effet en comparant deux arbres d'une même essence, de même âge et de dimensions semblables, ayant poussé l'un près de l'autre, on constate des différences de résistance vis-à-vis d'un même parasite. Ces différences entraînent avec elles des changements dans la vitesse de progression des champignons et dans la rapidité d'extension de leurs altérations (Scheffer et Cowling, 1966).

##### **I.1.4.1. Facteurs influant sur la résistance et la vulnérabilité des bois**

Les facteurs modifiant ces propriétés se rapportent principalement à la composition chimique du bois, à ses propriétés physiques, à son taux d'hydratation et d'aération (Zabel et Morell, 1992).

##### **I.1.4.1.1. Influence de la composition chimique du bois**

La transformation progressive de l'aubier en bois de cœur, phénomène connu sous le nom de duraminisation (Shain et Mackay, 1973), s'accompagne de toute une série de transformations, dont beaucoup créent un milieu défavorable au développement des champignons. Le bois de



cœur, étant donné son degré de déshydratation assez poussé, contient dans de fortes proportions des substances plus ou moins toxiques pour les champignons, certaines constituant de véritables antifongiques tels les stilbènes (Schultz *et al.*, 1990), les flavonoïdes, les tannins, et des alcaloïdes, des produits phénoliques, des résines (Hillis, 1972 ; Zabel et Morell, 1992).

#### **I.1.4.1.2. Influence des propriétés physiques du bois**

Les propriétés physiques des bois telles que la structure anatomique, la proportion des cellules lignifiées, la dureté, la cohésion et la densité, interviennent fort peu comme facteurs de résistance aux altérations biologiques (Magel *et al.*, 1995). La densité ne représente pas un facteur de durabilité si l'on compare entre elles différentes essences ; en revanche, dans une même espèce botanique, les bois les plus denses se montrent les plus résistants (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986).

#### **I.1.4.1.3. Influence du taux d'hydratation et d'aération des bois**

Bien que la plupart des champignons lignivores soient très ubiquistes et capables de s'adapter ou de survivre à des conditions sévères de privation d'oxygène et de dessiccation, leur croissance optimum n'a lieu qu'en présence de proportions équilibrées d'air et d'eau (Ohsawa *et al.*, 1992).

#### **I.1.4.1.4. Influence des facteurs extrinsèques d'ordre climatique**

C'est surtout la température et l'humidité qui peuvent agir sur la croissance des champignons lignicoles (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986) ; l'humidité de l'air possède une très grande influence sur le développement des champignons dans les bois débités et œuvres. On les rencontre en effet de préférence dans les locaux exposés à une grande humidité, ou bien pour lesquels on a employé lors de leur construction, des bois insuffisamment secs et non traités préventivement (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986). Le manque d'hygiène, une aération insuffisante, l'existence de phénomènes de condensation, l'eau persistant à l'état liquide à la surface des bois constituent des conditions très favorables au développement des champignons (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986).

#### **I.1.4.2. Echelle ou classes de durabilité naturelle**

La résistance du bois aux attaques de champignons est variable selon les espèces ligneuses. Findlay en 1985 cité par Eaton *et al.* (1993) a, le premier conçu une échelle de durabilité naturelle à l'égard des champignons ; cette échelle comprend cinq classes. Ces cinq classes de

durabilité naturelle à l'égard des champignons, à savoir, très durable, durable, moyennement durable, non durable et périssable ont été définies sur une base comparative entre essais en laboratoire consistant à caractériser la durabilité d'un bois à partir de la mesure de sa perte de masse observée pour une exposition aux champignons lignivores en particulier aux Basidiomycètes. Des "essais de champ" souvent effectués en zone tropicale peuvent compléter ces études de durabilité naturelle.

Par rapport au risque mycologique, Roosen en 1951 cité par Eaton *et al.* (1993) affirme que les bois très durables pourront être employés dans de mauvaises conditions ; les bois durables conviendront à des usages extérieurs sans protection particulière pour autant qu'ils ne soient pas employés au contact permanent du sol ; les bois moyennement durables exigent une protection pour des emplois extérieurs et peuvent être utilisés sans protection à l'intérieur ; les bois peu durables ne peuvent être utilisés sans protection que dans les endroits sous abri parfaitement aérés ; les bois non durables requièrent dans tous les cas un traitement de préservation afin d'accroître artificiellement la durée de mise en œuvre.

En 1985, Findley et Anon cités par Eaton *et al.* (1993) propose des correspondances entre les pertes de masse mesurées en laboratoire, les classes de durabilité naturelle et les durées de vie du bois en extérieur en conditions tempérées et tropicales.

Afin de parvenir à une harmonisation européenne pour la caractérisation de cette propriété biologique, le comité européen de normalisation a élaboré en juillet 1994 la norme EN 350-1 qui préconise de classer la durabilité naturelle d'un bois en se référant à sa perte de masse relative « x » (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Classes de durabilité naturelle du bois vis-à-vis des champignons lignivores définies selon la norme EN 350-1

<i>Classe de durabilité</i>	<i>Description</i>	<i>x : Perte de masse relative</i>
1	Très durable	$x = 0,5$
2	Durable	$0,15 < x = 0,30$
3	Moyennement durable	$0,30 < x = 0,60$
4	Peu durable	$0,60 < x = 0,90$
5	Non durable	$x = 0,90$

En règle général, l'aubier a une durabilité naturelle moindre que le duramen à l'égard des champignons comme à celui des insectes xylophages ; sa conservation requière l'usage quasiment systématique de produit de traitement visant à accroître sa durabilité naturelle.

Il convient de rappeler que la durabilité naturelle n'a pas de caractère global vis-à-vis de l'ensemble des organismes vivants susceptibles de détériorer le bois (Fougerousse, 1979). En effet, la résistance naturelle d'une espèce ligneuse à l'action des champignons n'est pas forcément liée à sa résistance naturelle aux attaques d'insectes.

## **I.2. Relation entre la composition du bois et sa sensibilité aux altérations biologiques**

Les altérations de nature microbiologique du bois sont essentiellement dues à l'action d'un groupe particulier de cryptogames, les champignons lignicoles (vivant sur le bois) encore appelés lignivores (se nourrissant du bois). Les champignons attaquant tout spécialement les bois pour la plupart des Basidiomycètes, appartiennent à l'ordre des Agaricales ou des Aphylllophorales mais également aux Ascomycètes, de la famille des Xylariacées et aussi aux Deutéromycètes (*Fungi imperfecti*).

### **I.2.1- Propagation des champignons et progression des altérations**

Selon le moment auquel ils infectent le bois et la persistance de leur activité enzymatique dans les bois, on peut distinguer trois catégories de champignons lignicoles (1) les champignons s'introduisant dans l'arbre vivant, sur pied et dont le développement cesse après l'abattage ; (2) les espèces attaquant l'arbre sur pied, mais capables de continuer leur croissance après l'abattage; (3) les espèces infectant préférentiellement les bois abattus, ou bien les bois débités ou même œuvrés.

Les champignons lignicoles sont capables de se développer sur un grand nombre d'espèces de bois différentes (Highley, 1987) ; cependant certains paraissent inféodés à une essence en particulier. C'est ainsi que les champignons de pourriture fibreuse se trouvent plus souvent sur les Angiospermes que sur les Gymnospermes (Gilbertson, 1980). En effet, les unités syringyl de la lignine sont préférentiellement dégradées par les pourritures fibreuses que les unités guaïacyl (Gilbertson, 1980). Quelques exemples d'arbres sur pied, abattus ou œuvrés attaqués par des champignons lignivores Basidiomycètes sont présentés dans l'Annexe 1.

Les altérations débutent souvent, comme l'infection elle-même, dans l'aubier, plus vulnérable et peuvent rester longtemps ou même toujours localisées à cette zone du bois sans s'étendre au cœur. La rapidité d'extension des altérations, en corrélation avec celle de croissance du champignon, varie beaucoup en fonction de trois facteurs principaux : i) l'espèce botanique du bois (son âge, aubier ou cœur), ii) l'axe de propagation (longitudinal, radial ou transversal), iii) l'espèce cryptogamique agissante. Lorsque les conditions de vie deviennent trop défavorables, les champignons cessent de croître et de

s'étendre tout en se maintenant en vie et ont la faculté de reprendre leur activité si les conditions le permettent ; cet état de latence qu'on observe surtout sur les bois débités ou ouvrés, peut se prolonger plusieurs années (Greaves et Levy, 1969 ; Gilbertson, 1980 ; Eriksson *et al.*, 1990 ; Blanchette *et al.*, 1990).

### I.2.2. Modes d'action des champignons

Quelque soit le type de champignon, le mycélium (Figure I.5) dégrade les substances de réserves se trouvant dans les rayons parenchymateux, se développe à partir des rayons et circule dans les vaisseaux par pénétration passive à travers les ponctuations. Une fois les réserves épuisées, débute la pénétration active avec dégradation du bois. On peut alors distinguer différents types de pourriture, les pourritures blanches ou fibreuses et les pourritures brunes ou cubiques (Findley et Lévy, 1969 ; Greaves et Lévy, 1969 ; Liese, 1970 ; Dirol, 1976 ; Eriksson *et al.*, 1990 ; Blanchette *et al.*, 1990).

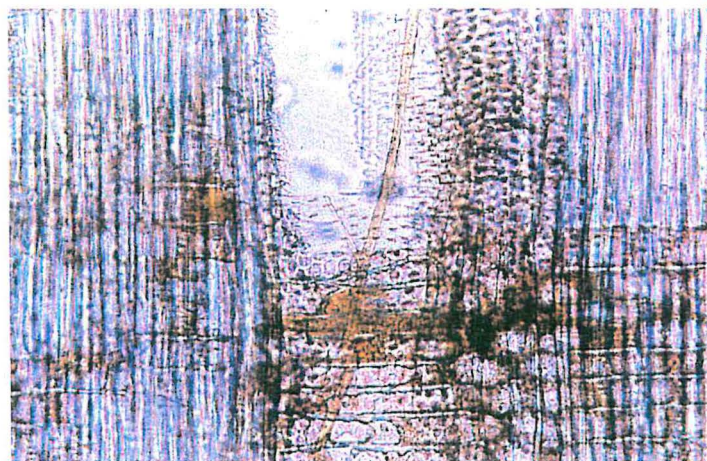


Figure I.5 : *Trametes versicolor* envahissant des cellules d'aubier de hêtre.

Les champignons vont dégrader le bois de plusieurs manières selon les espèces.

Les uns attaquent de préférence la lignine en premier lieu, puis ensuite seulement la cellulose, ou laissent à peu près intacts les éléments cellulotiques ; c'est le cas des champignons responsables de pourritures fibreuses, dans lesquelles le bois devient blanc et spongieux, se désagrège en éléments fins, en fibres allongées. Le bois se disloque dans une seule direction et la masse du bois prend un aspect de charpie (Figure I.6).





Figure I.6 : Traverse du métro de Caracas (Venezuela) attaquée par un champignon de pourriture fibreuse

D'autres au contraire hydrolysent la cellulose en premier et la lignine en second, ou la cellulose seulement ; ce sont des espèces qui généralement produisent des pourritures cubiques. Les dégâts causés par cette pourriture se caractérisent par une fragmentation du bois suivant trois axes de clivage perpendiculaires ; cela aboutit à la formation de fragments cubiques réguliers plus ou moins gros, séparés par des fentes de largeur et de profondeur variables (Figure I.7).



Figure I.7 Fragment de bois indéterminé attaqué par un champignon de pourriture cubique

Enfin certains décomposent simultanément ces deux substances, lignine et cellulose, transformant le bois en une matière poreuse. Il est rare qu'une espèce détruise d'une façon strictement sélective l'un de ces deux composants, sans que l'autre ne soit également altéré (Enoki *et al.*, 1988).

#### *Les champignons de pourriture fibreuse*

Ils dégradent lentement les polysaccharides tandis que la lignine est dégradée rapidement et à vitesse constante (Blanchette *et al.*, 1994). La lignine est un composé très stable et le



champignon doit utiliser une partie importante de son énergie pour la dégrader (Blanchette *et al.*, 1994) et pour compenser cette perte d'énergie, le champignon utilise les produits solubles de dégradation des polysaccharides au fur et à mesure qu'ils sont libérés (Blanchette *et al.*, 1990).

L'observation microscopique du bois permet de mettre en évidence que le champignon attaque d'abord la couche S3 puis, progressivement les couches S2 et S1 (Dirol, 1976 ; Blanchette *et al.*, 1990). L'élargissement des perforations par lesquelles l'hyphe va de cellule en cellule se fait progressivement et uniformément pour toute la paroi cellulaire indiquant ainsi que la dégradation des différentes couches se fait à la même vitesse (Dirol, 1976 ; Blanchette *et al.*, 1990).

Malgré son aptitude à dégrader la lignine, le champignon de pourriture fibreuse attaque d'abord les zones les moins lignifiées (Liese, 1970). La lignine est dégradée simultanément dans les différentes couches de la paroi secondaire, dans la paroi primaire et dans la lamelle moyenne (Cowling, 1961 ; Dirol, 1976 ; Eriksson *et al.*, 1990 ; Blanchette *et al.*, 1990). La production des enzymes de délignification et des enzymes cellulolytiques peut être simultanée chez *Trametes versicolor*, *Ganoderma applanatum* et *Heterobasidion annosum* (Cowling, 1961 ; Eriksson *et al.*, 1990). En revanche, chez *Phellinus nigrolimitatus*, seule la production d'enzymes de délignification est notée (Blanchette *et al.*, 1990).

#### *Les champignons de pourriture cubique*

L'observation microscopique du bois permet de mettre en évidence que la couche S2 est dégradée complètement puis S1 puis parfois S3 (Dirol, 1977). D'après Cowling (1961), les cellulases de *Poria monticola* agissent surtout dans les régions amorphes des microfibrilles. L'activité hémicellulase de nombreux champignons de pourriture de bois et, parmi eux, les champignons de pourriture cubique, se réalise souvent avant l'activité cellulase (Cowling, 1961). On note alors un dégagement de la structure microfibrillaire avant que les zones cristallines ne soient attaquées (Cowling, 1961 ; Dirol, 1977). Les zones éclaircies autour de l'hyphe au niveau de la perforation sont plus larges que la perforation elle-même (Dirol, 1977) car la diffusion des enzymes se fait essentiellement à partir de l'hyphe se trouvant au niveau de la perforation (Dirol, 1977).

### **I.2.3. Les enzymes impliquées dans la dégradation des lignines, de la cellulose et des hémicelluloses**

Lorsque les champignons lignivores dégradent la lignine et la cellulose des parois cellulaires des bois, ils mettent en œuvre un ensemble de systèmes enzymatiques. Certains enzymes sont sécrétés par les cellules dans lesquelles elles sont formées et agissent donc à l'extérieur de ces cellules : ce sont des enzymes exocellulaires, alors que d'autres demeurent dans les cellules et exercent leur action sur les substances dialysées à travers les membranes cellulaires : ce sont des enzymes endocellulaires.

Cependant, toutes les zones anatomiques des parois ne sont pas dégradées de la même façon ni avec la même facilité (Blanchette *et al.*, 1990). Des études de la dégradation des bois de bouleau et de peuplier par *Phlebia radiata* ont montré que les modes de dégradation réalisés par un même champignon sur des substrats lignocellulosiques différents ne sont pas les mêmes (Ambert, 1996). On peut en conclure que non seulement l'équipement enzymatique des champignons est à prendre en compte, mais aussi la composition chimique des parois du substrat dégradé. Des études ont montré qu'il existe une relation entre la nature des lignines, leur distribution anatomique et la morphologie de la dégradation. Ainsi Higuchi (1989), Wariishi *et al.* (1989), Hammel et Moen (1991) en étudiant des composés modèles ont montré que les enzymes ligninolytiques des champignons comme la lignine peroxydase (LiP), la manganèse peroxydase (MnP) et la laccase (Lac) attaquent les structures des lignines Gaiacyle-Syringyle (GS) non-condensées. D'une part, la présence de lignines condensées apparaît être associée à la résistance à la dégradation de certaines couches de la paroi. La nature de la lignine et sa répartition ultrastructurale dans les parois semble donc fortement influencer le mode de dégradation réalisé par les champignons. D'autre part, les auteurs Perez et Jeffries (1992) suggère que la synthèse de ces principales enzymes oxydatives fongiques est régulée au niveau de la transcription des gènes et liée à des facteurs environnementaux comme la nature de la lignine.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux principales enzymes de dégradation de la lignine et de la cellulose comme la lignine peroxydase (LiP), la manganèse peroxydase (MnP), l'aryl-alcool oxydase (AAO), la Laccase (Lac), la cellulase et les hemicellulases.

### I.2.3.1. Les enzymes impliquées dans la dégradation des lignines

Un certain nombre de souches de champignons de pourriture fibreuse et de pourriture cubique ont montré des aptitudes particulières pour la dégradation de la lignine. Parmi les champignons de pourriture fibreuse, *Ceriporiopsis subvermispora* dégrade fortement la lignine (Otjen *et al.*, 1987 ; Akhtar *et al.*, 1992). C'est aussi le cas de *Phlebia radiata* dont la production d'enzymes ligninolytiques a été bien étudiée en milieu liquide (Niku-Paavola *et al.*, 1988 ; 1990). Cependant, la plus grande partie des travaux relatifs à la dégradation des lignines et des parois cellulaires lignifiées a été réalisée avec le champignon de pourriture fibreuse, *Phanerochaete chrysosporium* (Erikson *et al.*, 1990).

Des études ont aussi été réalisées sur les enzymes ligninolytiques du champignon de la pourriture cubique, *Polyporus ostreiformis* (Dey *et al.*, 1991 ; D'Souza *et al.*, 1996).

La première enzyme responsable de la dépolymérisation de la lignine découverte chez *P. chrysosporium* est la lignine peroxydase (LiP) (Tien et Kirk, 1983 ; Glenn *et al.*, 1983) suivie d'une autre peroxydase, la dite « manganèse dépendante » (MnP) (Kuwahara *et al.*, 1984). A ces deux activités s'ajoute un système générateur de peroxyde d'hydrogène (Kersten et Kirk, 1987 ; Daniel *et al.*, 1994) et un système réducteur des radicaux phenoxy (Ander, 1994). Les deux peroxydases, la LiP et la MnP, jouent un rôle primordial dans l'oxydation de la lignine (Kirk et Farrell, 1987 ; Tien, 1987 ; Tuor *et al.*, 1995). Ce sont des glycoprotéines héminiques excrétées sous forme de plusieurs isoenzymes dans le milieu extracellulaire des cultures des champignons ligninolytiques.

#### *Lignine-peroxydase (LiP)*

La purification de cette enzyme a révélé, chez *P. chrysosporium*, la présence de six isoenzymes (Tien et Kirk, 1988). Le mécanisme d'action de la LiP, typique des peroxydases, conduit à la formation d'un radical -cation par abstraction d'un électron sur les noyaux aromatiques méthoxylés (Kersten *et al.*, 1985 ; Schoemaker *et al.*, 1985). Une des conséquences des réarrangements subséquents est la déméthoxylation du substrat (Tai *et al.*, 1983 ; Labat et Meunier, 1990). Au total, deux électrons sont mis en jeu par un mécanisme à deux étapes d'oxydation à un électron. Le cycle catalytique de cette enzyme présenté Figure I.8 met en évidence les étapes successives et indique également la sensibilité de l'enzyme qui est inactivée par des concentrations élevées en  $H_2O_2$  (Labat et Meunier, 1990).

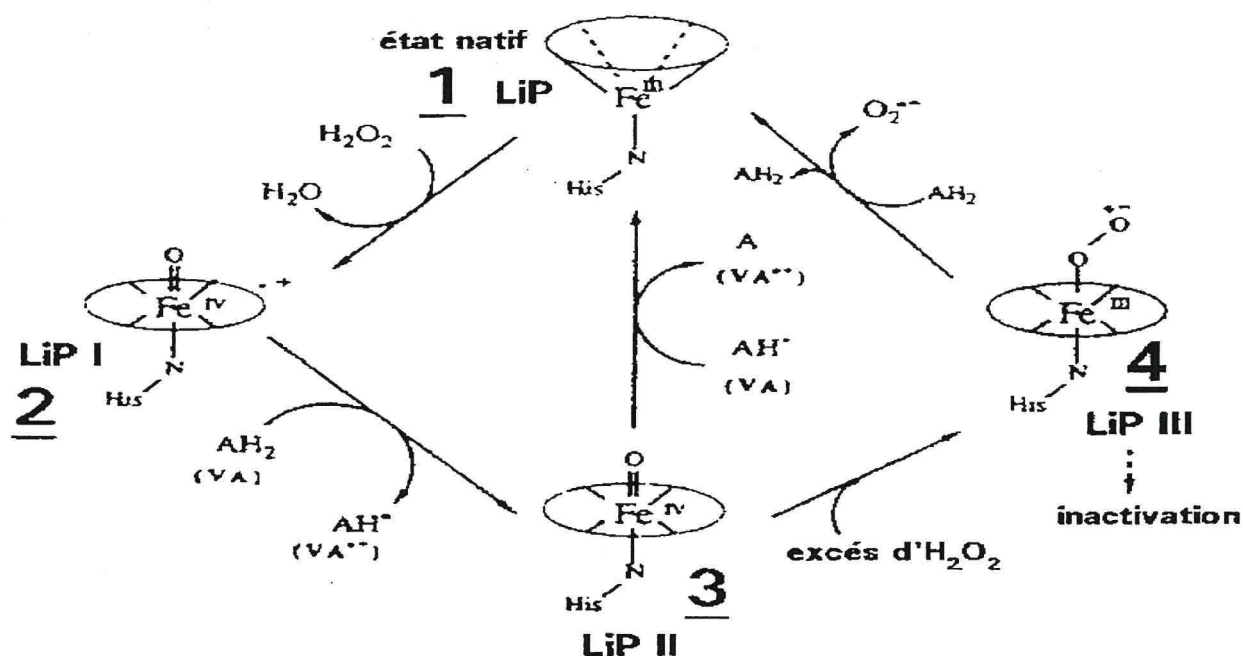


Figure I.8 – Cycle catalytique de la lignine peroxydase (LiP) d'après Labat et Meunier (1990).  
 1 : enzyme à l'état natif, Fe III haut spin ; 2 : [P<sup>o+</sup>]Fe<sup>IV</sup> = 0, composé I de LiP ; 3 : [P]Fe<sup>IV</sup> = 0, composé II de LiP ; 4 : [P]Fe<sup>III</sup>O<sup>2•-</sup> ([P]Fe<sup>II</sup>O<sup>2</sup>, composé III.  
 [P] : macrocycle porphyrine ; (VA) : alcool vératrylique ; (VA<sup>•+</sup>) : radical-cation de VA

### Manganèse-peroxydase (MnP)

De même que la LiP, la manganèse peroxydase est sécrétée par les champignons sous forme de plusieurs isoenzymes (Kuwahara *et al.*, 1984). L'enzyme, en plus des caractères classiques des peroxydases, se distingue par un mécanisme d'action qui met en jeu les ions manganèse II (Wariishi *et al.*, 1989). Le cycle catalytique présenté Figure I.9 met en évidence le rôle de Mn II comme médiateur du transfert d'électrons.



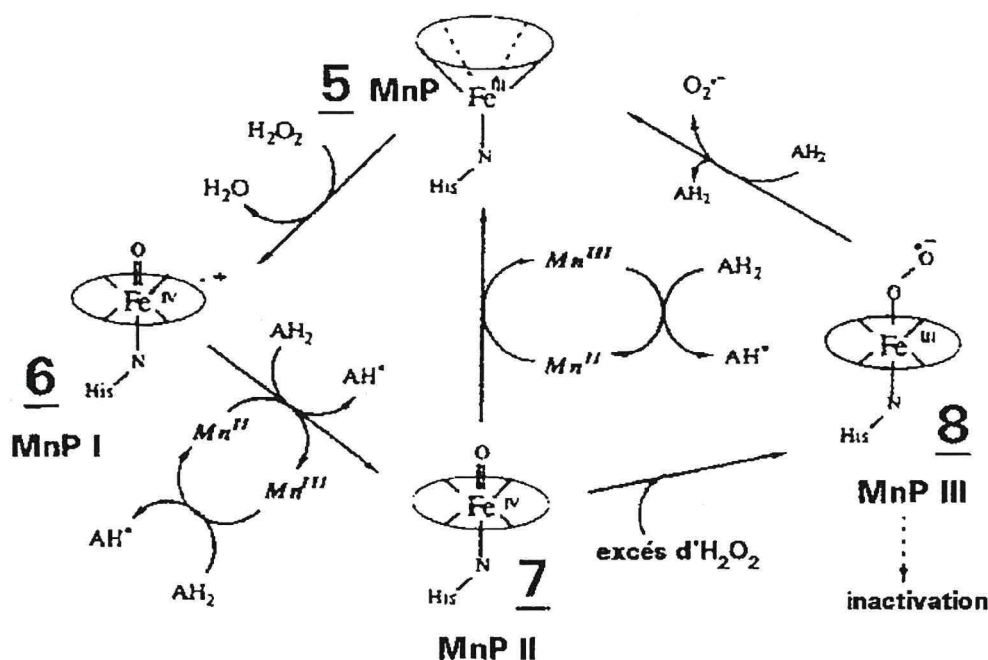


Figure I.9 – Cycle catalytique de la manganèse peroxydase (MnP) d'après Labat et Meunier (1990). 5 : enzyme à l'état natif, Fe III haut spin ; 6 : [P<sup>o+</sup>]Fe IV = 0, composé I de MnP ; 7 : [P]Fe IV = 0, composé II de MnP ; 8 : [P]Fe III O<sup>2-</sup> ↔ [P]Fe II O<sup>2-</sup>, composé III. [P] : macrocycle porphyrine ; AH<sup>2</sup> : substrat phénolique.

### La Laccase (Lac)

Il s'agit d'une phénol-oxydase possédant une spécificité large pour un grand nombre de substrats phénoliques. Elle est répertoriée comme une benzenediol O<sub>2</sub> oxydoréductase dont le mécanisme d'action consiste en une oxydation à un électron, mais qui, à la différence des peroxydases, n'implique pas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais le dioxygène (Figure I.10).

La laccase existe aussi, sous forme de plusieurs isoenzymes (Martinez *et al.*, 1994 ; Fukushima et Kirk, 1995 ; Salas *et al.*, 1995 ; Muñoz *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action de cette enzyme lui permettant d'oxyder efficacement les unités phénoliques libres de la lignine, en fait l'une des enzymes clés de l'attaque de la lignine par le complexe ligninolytique (Bourbonnais et Paice, 1990).

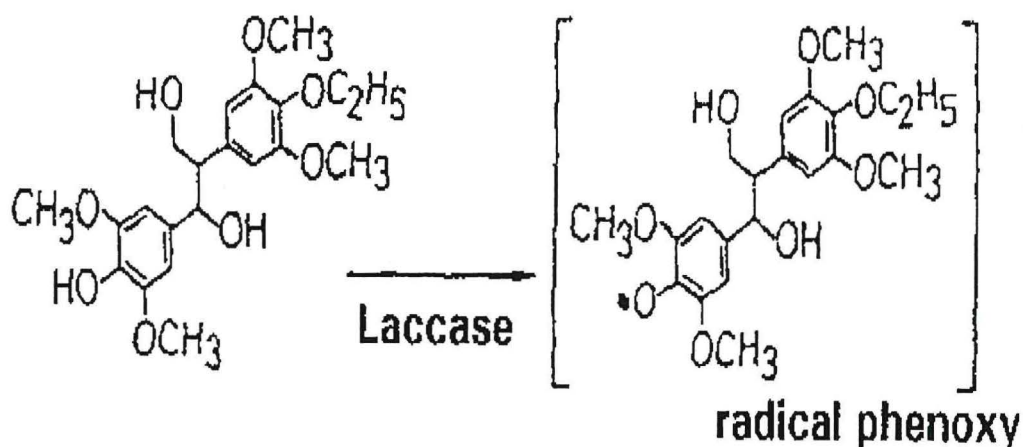


Figure I.10 – Oxydation des unités phénoliques libres de la lignine par la Laccase mettant en jeu une oxydation à un électron d'après Higuchi (1989).

#### *Les Phenol- oxydases dans la pourriture cubique*

Les champignons de pourriture cubique produiraient également des Phenol-oxydases de façon moins importante que les champignons de pourriture fibreuse et leur inaptitude à dégrader la lignine serait due à l'absence d'autres enzymes intervenant aux côtés des Phenol-oxydases chez les champignons de pourriture fibreuse (Kirk, 1973). Kirk se base sur l'augmentation du contenu en carbonyl observé durant une dégradation par les champignons de pourriture cubique. Cette augmentation en carbonyl pourrait être due aux quinones, aux aldéhydes et à d'autres produits résultant des clivages catalysés par les phénol-oxydases.

#### *Aryl-Alcool Oxydase (AAO)*

Il s'agit d'une des enzymes extracellulaires capables de générer de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette enzyme qui a été caractérisée chez différentes variétés de *Pleurotus* (Guillén *et al.*, 1990 ; 1992 ; 1994) puis de façon plus générale chez d'autres espèces (Pelaez *et al.*, 1995) y compris *Phanerochaete chrysosporium* (Asada *et al.*, 1995) a pour effet de produire  $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir de l'alcool véricolique.

#### *Autres oxydases*

##### *Champignons de pourriture fibreuse*

Un certain nombre d'autres enzymes extracellulaires capables de générer  $\text{H}_2\text{O}_2$  nécessaire au fonctionnement des peroxydases ont été caractérisées dans divers champignons. L'une des premières identifiées chez *P. chrysosporium* est la glyoxal oxydase (Glox) (Kersten et Kirk,



1987). Cette enzyme a par ailleurs été retrouvée chez d'autres espèces et notamment en fermentation solide de la paille par *P. radiata* (Vares *et al.*, 1995).

#### *Champignons de pourriture cubique*

Des observations ont montré que la principale différence existant entre champignons de pourriture fibreuse et champignons de pourriture cubique n'est pas la production ou non de polyphénoloxydases et de peroxydases mais la plus ou moins grande possibilité de passage de ces enzymes au travers des membranes cellulaires vers le milieu extérieur (Dey *et al.*, 1991 ; D'Souza *et al.*, 1996).

### **I.2.3.2. Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose**

#### *Les cellulases*

La production de cellulases extracellulaires est affectée différemment par la présence d'hydrates de carbone simples dans le milieu de culture suivant qu'il s'agisse de champignon de pourriture cubique ou de champignon de pourriture fibreuse (Highley, 1973 ; Micales et Higley, 1988 ; Highley *et al.*, 1989). Il faut cependant distinguer les modes de dégradation de la cellulose chez les champignons de pourriture fibreuse et les champignons de pourriture cubique. Le complexe cellulasique d'un champignon de pourriture fibreuse contient les composants suivants selon l'ordre dans lequel ils agissent sur la cellulose (Highley, 1973) : 1) *Le composant C1* qui hydrolyse la cellulose très orientée. Cela implique un clivage des liaisons hydrogènes entre les molécules de cellulose ; 2) *Les  $\beta$ .1-4 glucanases (Cx)* qui hydrolysent les liaisons glycosidiques dans la molécule de cellulose. On distingue deux types de  $\beta$ .1-4 glucanases, les *exo  $\beta$ .1-4 glucanases* qui libèrent des glucanes à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne cellulosique et les *endo  $\beta$ .1-4 glucanases* qui sont les plus fréquentes et qui coupent à l'intérieur de la chaîne cellulosique ; 3) *Les  $\beta$  glucosidases* qui ont une grande affinité pour la cellobiose (dimère  $\beta$  du glucose) hydrolysent les petits oligomères.

Les champignons de pourriture cubique ne produisent pas d'activité C1 quelque soit la source de carbone sur laquelle on le cultive (Ritschkoff et Viikari, 1994). L'action du composant C1 est remplacée par des réactions non enzymatiques rendues possibles par la sécrétion d' $H_2O_2$  par le champignon (Koenigs, 1974) ce qui permet le gonflement et donc l'augmentation de la porosité de la cellulose native permettant ainsi aux  $\beta$ .1-4 glucanases d'agir (Koenigs, 1974). Le composant Cx produit par les champignons de pourriture cubique semble constitutif puisque l'activité Cx reste importante même dans les cultures ne contenant comme source de carbone que des oses simples ou des polysaccharides non

cellulosiques (Highley, 1973). Durant la dégradation de la cellulose du bois, les cellulases du champignon de pourriture cubique sont exposées à une accumulation des produits solubles ce qui ne se produit pas avec un champignon de pourriture fibreuse puisque celui-ci métabolise les produits solubles au fur et à mesure qu'ils sont libérés à partir de la cellulose. Le fait d'avoir des enzymes Cx constitutives permet donc au champignon de pourriture cubique de continuer sa dégradation cellulolytique malgré l'accumulation des produits solubles (Highley, 1973).

#### *Les hémicellulases*

Pour les champignons de pourriture cubique comme pour les champignons de pourriture fibreuse, la nécessité d'un stade précellulolytique dans lequel les hémicellulases permettent une augmentation de l'accessibilité de la cellulose par la dégradation des hémicelluloses qui l'entourent a été suggérée par Bailey *et al.* (1968).

De nombreux champignons dont on a prouvé qu'ils sont cellulolytiques ont aussi des xylanases et des mannanases (Wood *et al.*, 1990). La taille de ces hémicellulases montrent qu'elles sont trop larges pour diffuser dans les capillaires du bois et ce sont des petites cellulases qui interviennent dans ce stade précellulolytique (Goodell *et al.*, 1995).

### **I.3. Caractères biologiques, reproductifs, systématiques, évolutifs et taxonomiques des champignons**

Dans cette partie après une description des principales étapes du cycle biologique des champignons, nous présenterons les systèmes d'incompatibilité des champignons et la place des Basidiomycètes dans la classification, groupe dans lequel se trouve la plupart des champignons qui dégradent le bois et qui font l'objet de notre étude.

Les champignons ou mycètes sont des eucaryotes et entretiennent des relations complexes avec le monde vivant. Organismes hétérotrophes se nourrissant par absorption, ils vivent en saprophytes, c'est-à-dire aux dépens de matières organiques, en tirant de celles-ci, l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur reproduction. Quand les deux organismes, mycètes et hôte, tirent chacun bénéfice de cette interaction, on parle de symbiose. Si le champignon tire seul avantage de cette interaction sans que cela nuise à l'hôte, l'interaction est appelée commensalisme. Les hôtes sont généralement ligneux, Gymnospermes ou Angiospermes. Cette diversité des partenaires marque une grande diversité fonctionnelle et sera prise en considération dans notre étude.

### **I.3.1. Le Cycle biologique**

#### *Les thalles filamenteux ou mycélium*

La plupart des champignons sont constitués d'une masse de cytoplasme plurinucléée ; cet état multi nucléé définit la structure cœnocylique du mycélium. Le mycélium est un ensemble de filaments ramifiés ou d'hyphes d'un diamètre moyen de 5 µm. Chacun de ces hyphes est constitué de cellules cylindriques, placées à la suite les unes des autres. Ces hyphes peuvent se développer de façon quasi-infinie et atteindre des dimensions telles qu'il est possible de les voir à l'oeil nu.

Les hyphes croissent par formation de nouvelles cellules à leur extrémité, ce qui donne au mycélium une croissance radiale ; en même temps apparaissent des branches latérales dont la multiplication aboutit à faire du mycélium un vaste ensemble de ramification formé de cellules ou d'hyphes. Il existe différents types d'hyphes :

- les hyphes non-cloisonnées ou hyphes syphonnées.

La structure du mycélium est continue quelles que soient les ramifications, avec une couche externe de cytoplasme multinucléé, et des vacuoles centrales. Le diamètre des hyphes est irrégulier. Les champignons ayant des hyphes non-cloisonnées appartiennent au groupe des Syphomycètes, ou Phycomycètes, encore appelés champignons inférieurs.

- les hyphes cloisonnées ou septées.

La masse cytoplasmique multinucléée est subdivisée en compartiments séparés par des cloisons. Celles-ci sont incomplètes : il subsiste une perforation permettant le passage de divers constituants. Il ne s'agit pas de membranes plasmiques mais de cloisons constituées essentiellement de chitine. Cette organisation caractérise les champignons supérieurs

#### *Multiplification des champignons*

Les mycètes disposent de deux modes de reproduction : sexuée ou asexuée. La reproduction asexuée fait appel à trois types de processus :

- La formation de spores asexuées. C'est le mode de reproduction asexuée le plus fréquent chez les mycètes,
- Le bourgeonnement, que l'on observe chez les levures notamment où la cellule fille se forme à partir d'une excroissance de la cellule mère,
- La fission binaire qui conduit à la formation de deux cellules filles de même volume.

Les spores asexuées sont produites en très grand nombre par des organes de fructification plus ou moins complexes et d'aspect variable selon les espèces. Le type d'organe au niveau duquel se forme les spores est d'ailleurs un caractère taxonomique important des mycètes.

Chez les champignons inférieurs ou Phycomycètes, les spores asexuées sont endogènes : elles

se forment à l'extrémité d'hyphes particulières. Dans tous les cas, la spore est capable de redonner un thalle identique.

Les mycètes sont aussi capables de se reproduire de façon sexuée même si ce mode de reproduction est plus rarement observé que la reproduction asexuée. Elle n'est d'ailleurs pas encore connue pour tous les genres et toutes les espèces. Les champignons supérieurs pour lesquels la reproduction sexuée n'a pas encore été observée sont regroupés dans la classe des Deutéromycètes ou champignons imparfaits. La reproduction sexuée ne survient que dans des conditions particulières et ses modalités sont complexes en général.

La reproduction sexuée caractérisée par la succession de phases haploïdes et diploïdes ne se produit que quand il y a rencontre de thalles de signes sexuels compatibles, désignés selon les cas par + ou -, ou a et b.

Ainsi, chez les champignons supérieurs, la fécondation s'effectue en deux temps (Figure I.11):

- La fusion des noyaux (caryogamie) ne suit pas immédiatement la fusion des cytoplasmes (plasmogamie). Entre les deux s'intercale une phase dihaploïde, durant laquelle le mycélium est constitué de cellules à deux noyaux complémentaires qui se divisent de façon synchrone. Ces cellules constituent le mycélium secondaire en opposition au mycélium haploïde qui est dit mycélium primaire (Figure I.12).
- La méiose suit en général très rapidement la caryogamie et produit des spores haploïdes dans des structures dont la forme est caractéristique. Chez les Ascomycètes, ce sont les asques dans lesquelles les spores sont internes. Chez les Basidiomycètes, ce sont les basides qui portent les spores à l'extrémité de courts pédoncules ou stérigmates.

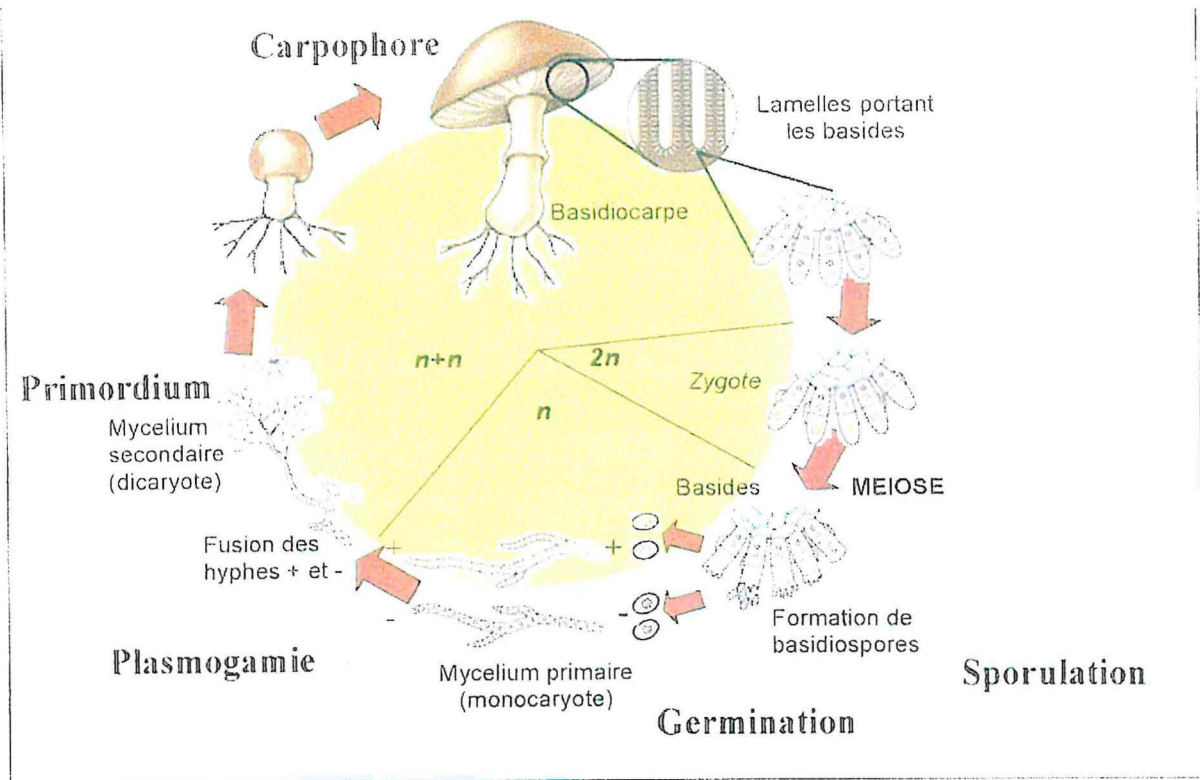


Figure I.11 : Principales étapes du cycle biologique des Basidiomycètes.

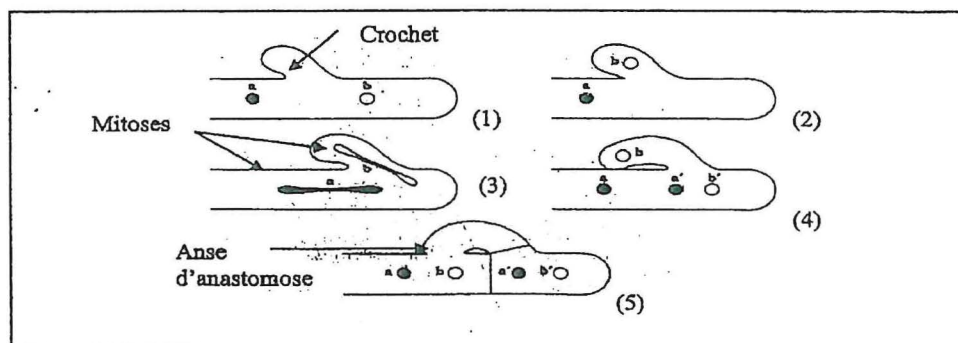


Figure I.12 Principales étapes de la croissance végétative des Basidiomycètes à l'état dicaryotique; a et b sont les noyaux des mycéliums primaires d'origine et a', b', leurs copies mitotiques ; (1) formation de l'hyphe dangeardienne ; (2) migration du noyau b ; (3) mitoses conjuguées des noyaux a et b ; (4) et (5) formation de la nouvelle cellule contenant les noyaux a' et b'.

Chez les champignons inférieurs, des hyphes de type sexuel compatible émettent l'un vers l'autre un prolongement latéral. La disparition de la cloison entraîne la formation d'un gamétange dans lequel s'effectue la plasmogamie puis la caryogamie. À l'issue de ce processus, il y a formation de plusieurs noyaux diploïdes et le gamétange se transforme en zygospore, dont la paroi est épaisse et verruqueuse.



### **I.3.2. Les systèmes d'incompatibilité chez les Basidiomycètes**

#### *Les différents systèmes d'incompatibilité*

En général, les systèmes d'incompatibilité chez les Basidiomycètes sont exprimés à trois niveaux (Hansen *et al.*, 1993) :

- Le système de compatibilité sexuelle qui contrôle la fusion entre hyphes homocaryotiques haploïdes pour former des hétérocaryons.
- Les systèmes d'interstérilité qui bloquent les fusions sexuelles entre individus de lieux différents.
- Le système d'incompatibilité somatique qui empêche les échanges libres de noyaux et de cytoplasmes entre individus hétérocaryotiques appartenant à la même population.

#### *Incompatibilité sexuelle*

Chez les espèces hétérothalliques l'existence de facteurs génétiques d'incompatibilité homogénique ont rendu impossible l'autofécondation et certains croisements. Chez les Basidiomycètes, ces facteurs sont généralement déterminés par des allèles multiples (Joly, 1978). La plasmogamie n'est possible qu'entre mycéliums haploïdes qui possèdent des allèles différents, soit pour un facteur A pour les espèces bipolaires, soit pour deux facteurs A et B chez les espèces tétrapolaires.

Il existe également des facteurs d'incompatibilité hétérogénique. Ce type d'incompatibilité s'observe lors de confrontations entre races d'une même espèce provenant de régions géographiques distinctes. Il est totalement indépendant, à la fois des facteurs sexuels et des facteurs d'incompatibilité homogénique. À la différence de ces derniers, les facteurs d'incompatibilité hétérogénique n'autorisent la plasmogamie réciproque qu'entre mycéliums porteurs d'allèle identiques à tous les sites d'incompatibilités (Joly, 1978).

#### *Hétérocaryose et variabilité génétique*

Les originalités de la redistribution des caractères génétiques chez les Basidiomycètes découlent de leur aptitude à l'hétérocaryose (c'est-à-dire la coexistence d'un cytoplasme commun de noyaux haploïdes génétiquement différenciés). On distingue deux types d'hétérocaryoses (Joly, 1978) :

- L'hétérocaryose sexuelle, avec des cellules binucléées qui s'intercalent entre la plasmogamie et la caryogamie. Les deux noyaux subissent des divisions mitotiques synchronisées : c'est la dicaryophase. Chaque cellule binucléée est un dicaryon,
- L'hétérocaryose asexuelle autorise des fusions asexuelles hétérozygotes donnant



naissance à des noyaux diploïdes susceptibles de subir des recombinaisons mitotiques et, après haploïdisation, de produire des noyaux haploïdes, recombinants génétiques.

#### *Les variations de la reproduction sexuée*

Certaines espèces de Basidiomycètes fondamentalement incompatibles, montrent une autofertilité. C'est la pseudocompatibilité ou = amphithallisme ou homothallisme secondaire (Joly, 1978).

#### *Incompatibilité somatique*

La confrontation binaire *in vitro* d'isolats dicaryotiques prélevés à partir de basidiomes ou de rhizomorphes ne permet pas la formation de nouveaux thalles dicaryotiques stables. Ce phénomène est appelé incompatibilité somatique ou végétative. Il permet de détecter deux types de mycéliums dicaryotiques au niveau intraspécifique (Korhonen, 1978) :

- Des mycéliums dicaryotiques compatibles somatiquement. Cette compatibilité se caractérise par un entremêlement des filaments mycéliens entre eux,
- Des mycéliums dicaryotiques incompatibles somatiquement et identifiés par l'existence de réactions antagonistes qui se manifestent par la formation d'une zone ou ligne de démarcation ou encore d'une zone de croissance mycélienne aberrante.

### **I.3.3. Place des basidiomycètes lignivores dans la classification**

Le règne des champignons se distingue du règne végétal par l'absence de photosynthèse dans sa nutrition et du règne animal par le fait que les champignons n'ingèrent pas leur nourriture mais l'absorbent. Les espèces du règne fongique sont réparties dans les quatre divisions suivantes : *Gymnomycota*, *Deuteromycota*, *Mastigomycota* et *Amastigomycota*. Suivant les auteurs, la classification des champignons comprend, cinq ou six grands groupes, dont deux sont parfois regroupés : les Myxomycètes et les Archimycètes. Pratiquement, aucun champignon lignivore n'est présent dans ces groupes. Par contre, les Phycomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Champignons imparfaits comprennent un grand nombre d'espèces qui dégradent le bois. À ce sujet dans la classification et la nomenclature, nous suivons le Synopsis Fungorum 7 de Ryvarden et Gilbertson (1993). Cependant, il faut rappeler que la classification systématique des champignons peut avoir un caractère subjectif. Cet aspect sera développé dans le chapitre suivant (Chapitre I.4). En effet, pour les champignons, la notion de taxon ou d'espèce telle qu'elle est définie pour le règne végétal ou animal, conduit à une interprétation complexe du fait de la difficulté (voire l'impossibilité) de constater les capacités de reproduction croisée et de fertilité de la descendance pour la plupart des espèces (Ainsworth *et al.*, 2001 ; Burnett, 2003).

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux Basidiomycètes qui comprennent un grand nombre d'espèces dégradant le bois et à leur place dans la classification.

Les espèces du règne fongique sont réparties dans les quatre divisions suivantes :

- *Gymnomycota* :

Les espèces de cette division sont caractérisées par un stade mobile et capables de phagocytose. On y retrouve notamment les Myxomycètes.

- *Deuteromycota* :

Ils sont plus connus sous le nom de “ champignons imparfaits ”, les spores à n chromosome formés sont appelées conidies. On y retrouve plus d'un tiers des agents fongiques connus, comme les *Penicillium* spp. utilisés dans la production industrielle de la pénicilline, dans la fabrication de fromages ou responsable de pourriture des agrumes.

Certains Deutéromycètes sont responsables de pourriture molle, d'autres sont agents des discolorations du bois. Les bois atteints de pourriture molle, aussi longtemps qu'ils restent humides ont une couleur plus foncée qu'à la normale ; leur consistance est très molle et la zone altérée s'écrase sous les doigts sans être fibreuse. Les colorations anormales du bois, quant à elles, sont dues aux champignons de discoloration. L'action de ces champignons sur le bois ne se traduit que par une modification de la couleur, sans modification de la structure physique et chimique du bois (Fougerousse, 1979).

- *Mastigomycota* :

Ce sont des champignons à reproduction sexuée, on y trouve des espèces importantes en agronomie telles que *Pythium*, responsables de la fonte des semis ou *Phytophthora infestans* et *Plasmora viticola*, responsables des mildious.

- *Amastigomycota* :

Ce sont des champignons à reproduction sexuée, on y retrouve selon le type d'hyphes, quatre sous-divisions : les Zygomycètes, à hyphe syphonnée, les Glömeromycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes, à hyphe cloisonnée.

- *Les Zygomycètes*

Ils comptent entre autres l'ordre des Mucorales où l'on retrouve le genre *Rhizoporus*, à l'origine d'altérations des fruits, des céréales ou encore responsable de la moisissure du pain. Le genre *Mucor* quant à lui est à l'origine d'accident de fabrication du fromage : “ les poils de chat ” traduisent son développement à la surface du fromage.

- *Les Glomeromycètes*

Ce sont des taxons récemment séparés des Zygomycètes (autrefois réunis avec les Endogonales ou érigés en ordre des Glomales) et actuellement divisés en quatre ordres monophylétiques, aux signatures surtout moléculaires : Glomérales, Archaéosporales, Diversisporales et Paraglomérales. On y trouve 150 espèces connues, fossiles depuis le Dévonien au moins (Redecker et *al.*, 2000 ; Schüßler et *al.*, 2001).

- *Les Ascomycètes :*

Ils se caractérisent par une reproduction sexuée donnant des ascospores contenues dans des asques. Certains sont à l'origine de pourriture cubique, fibreuse ou molle et aussi à l'origine des discolorations des bois comme *Ceratocystis picea* et *Pullularia pullulans*. On y retrouve des champignons importants tant par leur pathogénie humaine (Onygénales), leur pathogénie agricole (Erysiphales ou oïdiums de la vigne, du rosier, etc.), leur renom culinaire avec les morilles et les truffes, que par la quasi disparition de l'orme champêtre en Europe dû au *Ceratocystis ulmi*.

- *Les Basidiomycètes :*

Ils se caractérisent par une reproduction sexuée donnant des basides portées par des basidiocarpes. On y trouve des agents bien connus, tout d'abord sur le plan agronomique avec les Urédinales (responsable de la rouille des plantes), les Ustilaginales (agents du charbon des plantes), mais aussi sur le plan gastronomique (champignons de Paris, pleurotes, cèpes, chanterelles, ...) ou encore des champignons réputés pour leur toxicité tels que l'amanite phalloïde. C'est également dans cette sous-division qu'on retrouve la plupart des champignons des pourritures fibreuse et cubique.

On compte deux classes chez les Basidiomycètes : les Téliomycètes et les Hyménomycètes.

Pour la classe des Téliomycètes, on peut citer comme exemple de genres : *Gymnosporium* et *Leucosporidium*. Dans la classe des Hyménomycètes sont regroupés la majorité des champignons lignivores. Cette classe est elle-même divisée en deux sous-classes :

- La sous-classe des Phragmobasidiomycetidae : ce sont des champignons lignivores ou parasites. Les basidiospores germent généralement par réplication ou par formation de conidies.
- La sous-classe des Holobasidiomycetidae : ce sont des champignons lignivores et rarement parasites; on y observe deux ordres : les Agaricales et les Aphyllaphorales.

Les Agaricales sont des champignons à hyménophores généralement lamellés, parfois tubullés ou lisses. On y retrouve des genres connus tels que *Coprinus* (coprin), *Pleurotus* (pleurote),

*Armillaria* (armillaire) ou *Amanita* (amanite). Les Aphyllophorales contiennent des champignons à hyménophores généralement non lamellés. Les champignons lignivores qui ont fait l'objet de la présente étude appartiennent à cet ordre dont les principales familles sont : les Coniophoraceae, les Corticiaceae, les Ganodermataceae, les Hymenochaetaceae, les Polyporaceae et les Stereaceae.

#### **I.4. Espèce, phylogénie et évolution**

L'évolution tend à rendre compte des relations phylogénétiques entre les espèces depuis l'origine de la vie (Mayr, 1975). Le transformisme de Buffon, Lamarck puis Darwin, a permis l'émergence de cette théorie. La définition de l'espèce en constitue l'une des notions fondamentales. Pour reconnaître une espèce plusieurs critères peuvent être utilisés ; au premier rang l'interfécondité et l'interfécondité de la descendance mais aussi la morphologie. Il existe plusieurs définitions de l'espèce : biologique, phylogénétique, par reconnaissance, et cohésive (Mayden, 1997). Le concept biologique de l'espèce ne s'applique qu'à des populations naturelles et sympatriques. Cependant, en conditions de laboratoire, l'obtention d'une quelconque stérilité permet de conclure quant au statut spécifique des organismes que l'on croise, ce sont alors deux espèces présentant un isolement postzygotique (réduisant la viabilité ou la fertilité des hybrides). L'obtention d'hybrides fertiles n'est pas toujours concluante du fait de l'effacement des barrières prézygotiques (prévenant la formation d'hybrides entre espèces).

On décrit deux modes de spéciation en fonction des aires de distribution des populations concernées. La spéciation allopatrique repose sur un isolement reproductif dû à la mise en place d'une barrière géographique coupant la population initiale en deux populations. La spéciation péripatrique est une variante de la spéciation allopatrique, par effet de fondation. La spéciation sympatrique décrit la formation de deux espèces au sein d'une même population. La spéciation par le modèle des équilibres ponctués est un concept rendant compte des vitesses d'évolution au cours des temps géologiques.

La classification a pour objectif de retracer l'histoire évolutive des organismes et d'estimer le temps de divergence entre les organismes depuis leur dernier ancêtre commun. Parmi les méthodes utilisées pour reconstruire les phylogénies, la cladistique cherche à établir la parenté entre les taxons en s'intéressant aux caractères dérivés partagés par les taxons, en utilisant le principe du maximum de parcimonie. En cladistique, la phylogénie ne peut être valide que si elle repose sur des groupes monophylétiques. La phénétique quant à elle, étudie la parenté entre les taxons en s'intéressant à leur degré de similarité et repose sur l'utilisation de la méthode des distances pour reconstruire des phylogénies. Des méthodes permettent de tester



la validité d'un arbre, soit en testant la résistance des données à une perturbation (procédure du bootstrap), soit en comparant plusieurs jeux d'analyse de données afin de tester leur congruence. Un conflit phylogénétique peut exister entre données morphologiques et moléculaires, notamment lorsqu'il existe une homoplasie portant sur les caractères morphologiques.

#### **I.4.1. L'idée de l'évolution**

C'est vers la moitié du XVIII<sup>ème</sup> siècle que le fixisme commence à être remis en question. Le transformisme et le mutationnisme s'opposent peu à peu au fixisme. L'idée d'évolution, d'un lien entre les différentes formes organiques, d'une relation de parenté entre les êtres, émerge. Buffon est l'un des premiers naturalistes à suggérer que l'Homme et le singe appartiennent à la même famille. Avec Lamarck en 1809, la vision statique de la chaîne des êtres est remplacée par une vision gradualiste de l'évolution. On part alors à la recherche des chaînons manquants afin de relier sans faille tous les êtres entre eux.

#### **I.4.2. La notion d'espèce**

Une des premières traces écrites de la notion d'espèce, remonte au moins au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. avec Aristote qui dans sa classification des animaux utilisait le mot « *eidos* » pour désigner une unité élémentaire. Ce terme philosophique grec qui signifie « apparence » a été traduit en latin par le terme « *species* » d'où dérive le mot français espèce. Cependant, au cours du temps, ce terme perd son sens biologique et en acquiert d'autres. John Ray en 1686 redonne une acception moderne et biologique à ce terme. Le problème de la classification se pose alors dès la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle et concerne essentiellement les spécimens botaniques. Devant l'afflux de nouveaux spécimens provenant des mondes nouvellement découverts et la nécessité de pouvoir identifier facilement des plantes utiles en pharmacopée, la mise en place d'une classification s'impose.

Après toutes ces analyses, nous constatons que l'espèce a reçu une multitude de définitions, ce qui montre qu'aucune ne peut être reconnue comme universellement applicable en toutes circonstances et à toute entité biologique. En revanche, l'espèce recouvre deux concepts, celui de la classification et celui de l'évolution des taxons. Ainsi, la classification dont le but est de ranger les entités biologiques dans des catégories fixes, se heurte à la non-immuabilité des espèces. Mais pour notre objet, qui n'est pas la mycologie systématique, nous nous bornerons à une classification générale mais suffisamment précise pour que toute classification plus fine puisse s'y intégrer sans problème. Toutes les analyses suivantes sont nécessaires pour définir et pour donner un sens à l'espèce en particulier à la définition de l'espèce chez les Basidiomycètes.



#### **I.4.2.1. Les premières classifications et définitions de l'espèce**

##### *Le concept de l'espèce typologique*

Linné peut être considéré comme le fondateur de la classification actuelle. Dans la classification de Linné dont l'unité est le genre, seul le critère morphologique est pris en considération alors que cette classification est établie sur l'ébauche de celle de Ray (1627-1705) qui intégrait les critères morphologiques et de descendance.

L'identification d'une plante reposait alors sur une diagnose exprimée sous la forme d'une phrase qui décrit la plante. Linné la réduit dans un premier temps à 12 mots puis à deux. C'est la classification binomiale, introduite dans la dixième édition de «*Systema naturae*» 1758, toujours en usage. Les espèces sont définies par rapport à un individu de référence ou type déposé dans un Herbar.

##### *Le critère d'interfécondité*

Pour Buffon, la ressemblance entre les individus n'est qu'une idée accessoire et utilise le critère d'interfécondité/interstérilité pour décrire l'espèce. Buffon refuse la notion de genre, seule l'espèce constitue pour lui l'unité taxinomique de base. Il introduit cependant la notion de Famille qui définit le lien de parenté entre les espèces.

##### *Le critère de descendance*

Cuvier, fondateur de l'anatomie comparée introduit la théorie des corrélations selon laquelle les organes d'un animal sont fonctionnellement dépendants et en fait un principe de classification qu'il applique à l'étude des fossiles. Il tente de définir les rapports entre les êtres vivants en analysant leur organisation interne. Il définit l'espèce comme « une collection de tous les corps organisés nés les uns des autres ou de parents communs et de ceux qui leur ressemblent autant qu'ils se ressemblent entre eux ». Les critères de descendance et de morphologie sont tous les deux utilisés par Cuvier.

##### *La remise en cause de l'espèce par le transformisme*

Lamarck en 1778 dans sa « Flore française » note que « les noms ne sont que de pures conventions nécessaires à la vérité pour nous entendre, mais absolument étrangers à la marche de la Nature ». Pour Geoffroy Saint-Hilaire, dans son « Histoire naturelle générale des règnes organiques », « l'espèce est une collection ou une suite d'individus caractérisés par un ensemble de traits distinctifs dont la transmission est naturelle, régulière et indéfinie dans l'ordre actuel des choses ». Darwin en 1859 dans son ouvrage le plus célèbre « L'Origine des espèces » considère le terme d'espèce comme « arbitrairement appliqué pour plus de commodité à un

ensemble d'individus ayant entre eux de grandes ressemblances » et déclare « vaines les recherches auxquelles donnent lieu l'essence inconnue et indécouvrable du terme d'espèce ».

#### **I.4.2.2. La définition biologique de l'espèce**

Selon Mayr dans son ouvrage « Systematics and the origin of species » de 1942, « les espèces sont des groupes de populations naturelles réellement ou potentiellement capables de se croiser ». Ici le critère pris en compte est celui de l'interfécondité et de l'interfécondité de la descendance.

#### **I.4.2.3. Analyse des critères des définitions de l'espèce**

Trois critères utilisés seuls ou en association sont récurrents dans les définitions de l'espèce. Ce sont les critères morphologiques, de descendance et d'interfécondité/interstérilité.

##### *Le critère morphologique – notion de hiérarchisation des caractères*

Il y a deux façons de prendre en compte le critère morphologique dans la définition de l'espèce: soit d'utiliser la ressemblance et de regrouper ensemble ce qui se ressemble, soit d'utiliser la différence pour séparer ce qui ne se ressemble pas.

##### *Le critère de descendance*

Ce critère donne à l'espèce sa cohérence et reflète sa pérennité. Cependant, dans cette acception, l'espèce est considérée comme fixe. La notion de descendance avec modification doit être introduite pour refléter l'évolution des espèces.

##### *Le critère d'interfécondité*

Ce critère ne s'applique qu'en situation naturelle à des populations qui partagent la même aire de distribution, c'est à dire qui sont sympatriques, ce qui pose un certain nombre de difficultés, notamment celui de démontrer l'interfécondité.

En ce qui concerne des populations qui ne sont pas en sympatrie, le seul moyen de tester le critère d'interfécondité est de faire des expériences de croisement et de fertilité de la descendance.

#### **I.4.2.4. Les autres définitions de l'espèce**

La définition biologique de l'espèce telle que l'a formulée Mayr, comme nous venons de le voir, est difficile à mettre en pratique. Certains auteurs reprochent à la définition biologique de l'espèce de donner des indications sur le maintien du statut de l'espèce mais de ne pas donner une définition de ce statut. Aussi les biologistes sont-ils toujours à la recherche d'une

définition de l'espèce applicable en toutes circonstances. Depuis Mayr, différentes définitions ont été proposées.

#### *Le concept phylogénétique de l'espèce*

Ce concept a été développé par l'entomologiste allemand Hennig qui a proposé une méthode d'organisation du vivant à partir d'arbres évolutifs phylogénétiques. Hennig est le fondateur de la cladistique et considère que les seuls taxons à retenir sont des clades, c'est-à-dire des groupes constitués d'un ancêtre et de tous ses descendants. Les clades sont donc des groupes monophylétiques. Cracraft (1983) restreint la définition comme suit : une espèce est un groupe d'individus partageant une relation d'ascendance et de descendance.

#### *Le concept de l'espèce par reconnaissance*

Paterson dans les années 1980 introduit le critère de reconnaissance des partenaires sexuels. Ce concept nommé « concept de l'espèce par reconnaissance » s'oppose, par sa formulation, au concept de Mayr renommé par Paterson « concept de l'espèce par isolement ».

Ce concept met l'accent sur les mécanismes préservant le maintien de l'intégrité de l'espèce en privilégiant les systèmes de reconnaissance des partenaires sexuels. Il s'appuie sur les facteurs positifs permettant aux individus d'une même espèce de se reconnaître et de se reproduire, plutôt que sur les mécanismes d'isolement conduisant à l'arrêt des échanges géniques. L'espèce est alors définie de « l'intérieur » et non pas par référence aux individus qui lui sont extérieurs.

#### *Le concept de l'espèce cohésive*

Ce concept est introduit par Templeton en 1989. Si rien ne s'oppose à un échange génétique ou démographique entre des populations locales et si ces échanges n'entraînent aucune modification de leurs niches écologiques alors ces populations sont dites cohésives. Ce concept définit l'espèce en termes de cohésion génétique et phénotypique, les populations devant avoir les mêmes aptitudes à tolérer les variables écologiques.

Aujourd'hui, le concept de l'espèce phylogénétique repose sur l'utilisation d'un ensemble de caractères morphologiques et/ou génétiques. Certains auteurs proposent également d'utiliser des seuils de distances génétiques pour définir les espèces, ce qui est loin d'être toujours pertinent.

Différents champs disciplinaires de la biologie s'efforcent d'éclaircir la notion d'espèce. La morphométrie s'attache à la relation de la ressemblance, la génétique à celle de l'interfécondité, la cladistique à celle de la descendance et de l'évolution des caractères, et la biologie moléculaire à celle de l'homologie de l'ADN.

### **I.4.3. La Notion d'espèce chez les Basidiomycètes**

L'étude systématique des champignons ne commence vraiment qu'à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle. Les planches en couleurs de Bulliard (1752-1793) réunies sous le nom d'Histoire des Champignons, puis les travaux de Persoon (1761-1836) aboutissent au travail du Suédois Elias Magnus Fries (1794-1878), le père de la mycologie descriptive, *Systema Mycologicum* (1821) qui est son principal ouvrage.

Comme nous venons de le présenter, les concepts et définitions de l'espèce ont été longuement débattus et continuent d'évoluer. Mayden (1997) reprend 22 concepts énoncés dans la littérature définissant la notion d'espèce, dont le plus communément admis est le «*Biological species concept* » (Mayr, 1982). Ces concepts d'espèces sont basés sur des données biologiques, des homologues phénotypiques, des paramètres écologiques, et parfois des données moléculaires, l'ensemble constituant la taxonomie polyphasique, c'est-à-dire s'appuyant sur un ensemble de caractères, tant phénotypiques que moléculaires et biologiques. Chez les champignons, on observe fréquemment des populations, éventuellement sympatriques, isolées génétiquement au sein d'une espèce phénétique : aucun croisement n'est possible, sauf éventuellement à très faible fréquence, d'une population à l'autre. Un tel système d'incompatibilité est fréquent chez les Basidiomycètes (Boidin, 1986). Ces groupes d'interstérilité constituent en fait des "espèces biologiques" et peuvent parfois être corrélés à des différenciations morphologiques ou à des spectres d'hôtes distincts. Parfois pourtant, comme pour *Laccaria laccata*, *Heterobasidion annosum* ou certaines *Armillaria* (Korhonen, 1987), la définition phénétique est conservée car on néglige les interstérilités pour des raisons pratiques (critère peu opérationnel et risque de morcellement des espèces). De cette relative confusion ressort donc l'idée que la notion d'espèce reste complexe en mycologie.

### **I.5. Méthodes de caractérisation taxonomique applicables aux Basidiomycètes**

Les méthodes de caractérisation dont nous disposons actuellement sont multiples et s'adressent à diverses propriétés des champignons. Certaines méthodes utilisées depuis fort longtemps ont été l'objet d'améliorations constantes ; d'autres très récentes font appel à nos connaissances nouvelles en biologie moléculaire. Les particularités propres à chacune de ces méthodes seront présentées à la fois dans l'optique d'une identification et dans celle d'une détection.

### **I.5.1. Caractérisation morphologique et anatomique**

Les méthodes descriptives utilisées pour la caractérisation nécessaire à l'identification des espèces de champignons se basent sur des caractères morphologiques et anatomiques des basidiomes (Stalpers, 1978 ; Bon, 1988 ; Andary *et al.*, 1991 ; Courtecuisse et Duhem, 1994). La description des basidiomes est utilisée pour des identifications au niveau générique et spécifique. Ces méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques des champignons demeurent incontournables. Cependant, ces méthodes possèdent des limites pour la caractérisation et l'identification de ces champignons au niveau inter et intraspécifique. Elles ne permettent pas toujours l'identification avec certitude des cultures mycéliennes de certaines espèces ; elles restent fastidieuses et incompatibles avec un diagnostic de routine sur du mycélium secondaire par exemple.

### **I.5.2. Caractérisation et identification par électrophorèse des protéines ou des isoenzymes**

L'électrophorèse permet de révéler les protéines ou les isoenzymes à partir d'extraits protéiques de divers tissus (spores, sporophores, mycélium végétatif, *etc.*) après migration et révélation des gels électrophorétiques.

La technique du SDS/PAGE est une électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante en présence d'un détergent qui est le dodecyl sulfate de sodium (SDS). Elle a été proposée comme un outil d'identification pour *Serpula lacrymans*, agent de pourriture cubique sévissant notamment dans les habitations (Schmidt et Kebernik, 1989 ; Vigrow *et al.*, 1991 ; Palfreyman *et al.*, 1991 ; Schmidt et Moreth, 1995). Cette technique peut être rapide si les cultures sont pures.

### **I.5.3. Limites du système d'incompatibilité**

Le déterminisme génétique de l'incompatibilité végétative a été analysé chez de nombreuses espèces de champignons et les progrès récents de la génétique moléculaire chez ces organismes ont permis d'aborder l'étude de ce phénomène au niveau moléculaire. Korhonen (1978) a observé chez *Armillaria mellea*, l'existence de cinq groupes de souches intercompatibles en Europe. Dans tous les cas et principalement du fait de la quasi-impossibilité de quantifier les réactions observées entre thalles, il est très difficile de l'interpréter. Jacobson *et al.* (1993) en observant une absence de transitivité de la compatibilité somatique entre isolats de *Suillus granulatus* et en révélant des marqueurs moléculaires par RAPD, ont montré que les isolats compatibles somatiquement ne sont pas nécessairement génétiquement identiques.



#### I.5.4. Caractérisation et identification immunologique

Les techniques de caractérisation et d'identification immunologique restent des techniques très sensibles et très fiables. Beaucoup d'auteurs se sont investis dans la mise en œuvre de ces techniques (Palfreyman *et al.*, 1988 ; Breuil, 1987 ; Goodel et Jellison, 1986 ; Clausen *et al.*, 1990 ; Breuil *et al.*, 1990 ; Cahill et Hardham, 1994 ; Clausen, 1996 ; Clausen et Green, 1997). Toutes ces différentes techniques (immunofluorescence, immunodiffusion, immunoagglutination, ELISA, *etc*) utilisent des antisérums polyclonaux ou des anticorps monoclonaux. Ces antisérums sont produits par des souris ou par des lapins comme réponse à l'injection de fragments de mycélium, d'extraits ou de filtrats de culture de champignons lignivores. Des détections de champignons dans le bois se sont révélées positives chez les champignons de pourriture cubique : *Gloeophyllum trabeum*, *Antrodia carbonica*, *Lentinus lepideus*, *Serpula incrassata*, *Coniophora puteana* (Clausen *et al.*, 1990), *Postia placenta*, *Serpula lacrymans* (Vigrow *et al.*, 1989) et chez les champignons de bleuissement : *Ophiostoma* sp. (Breuil, 1987 ; Breuil *et al.*, 1990). Souvent des réactions croisées avec des organismes non cibles faussent les résultats, Toft (1993). En général, toutes ces méthodes se sont montrées très sensibles au niveau générique, interspécifique et intraspécifique (Clausen *et al.*, 1993). Elles n'exigent pas l'obtention d'isolement pur ce qui peut en faire une méthode de détection précoce *in situ* (Clausen *et al.*, 1993) utilisable à plus grande échelle.

#### I.5.5. Caractérisation et identification moléculaire

Des outils de typage moléculaire comme l'ADN ribosomal nucléaire, l'ADN ribosomal mitochondrial, le gène codant la  $\beta$ -tubuline et les autres marqueurs moléculaires utilisés dans l'identification des champignons dégradant le bois vont être abordés dans cette partie.

##### *L'ADN ribosomal nucléaire*

L'ADN ribosomal nucléaire est présent en de multiples copies à l'intérieur du génome comportant à la fois des régions variables et des régions très conservées et la plupart des données existant actuellement concernent cette région de l'ADN. Ainsi ses variations sont relativement bien connues chez de nombreux organismes, y compris certains champignons (Henrion *et al.*, 1992 ; Berbee et Taylor, 1993 ; Cullings et Vogler, 1998).

La région choisie de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire est la zone comprise entre les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') spécifiques des champignons (Gardes et Bruns, 1993). Cette région comprend le gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 5.8S, peu variable

ainsi que l'ITS1 et l'ITS2 qui séparent respectivement ce gène du gène 18S et du gène 28S. L'ITS 1 et l'ITS 2 ne sont pas exprimés ; de ce fait, d'éventuelles variations y sont plus probables, ce qui engendre une grande variabilité de ces régions.

#### *Les marqueurs mitochondriaux*

Les populations des mitochondries peuvent théoriquement être structurées différemment des populations de noyaux (Bruns *et al.*, 1988). Toutefois, cette structure ne peut pas être complètement indépendante de la structure nucléaire (Barroso et Labarère, 1997). L'ADN mitochondrial (ADNm) fongique est variable, dans son organisation globale (Grossman et Hudspeth, 1988) comme dans sa taille (Bruns *et al.*, 1988). Cette variabilité conduit à des différences intraspécifiques (Barroso et Labarère, 1997). L'amplification de l'ADNr mitochondrial a révélé des différences intraspécifiques bien connues dans la grande sous-unité (LrDNA) du genre *Laccaria* (Bruns *et al.*, 1991). La petite sous-unité de l'ADNr mitochondrial est également polymorphe d'une espèce à l'autre cela, en longueur et en séquence (Gardes *et al.*, 1991). Ce marqueur a permis de montrer l'implication d'espèces ectomycorhiziennes dans certaines endomycorhizes d'Ericales (Cullings *et al.*, 1996) et d'Orchidées (Taylor et Bruns, 1997).

#### *Le gène de la $\beta$ -tubuline*

Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont des polypeptides qui s'assemblent en dimères pour donner des protofilaments. Ces protofilaments constituent le microtubule qui est une fibre constitutive du cytosquelette. Des couples d'oligonucléotides « universels » ont été définis par Glass et Donaldson (1995) dans des régions codant la  $\beta$ -tubuline car ces régions sont bien conservées. Entre ces régions codantes se trouvent des introns, dont la taille et la structure sont beaucoup moins bien conservées. Les introns ont une évolution plus rapide, mais homogène pour un groupe, ce qui permet d'établir des liens de parenté phylogénétique, ainsi un polymorphisme de taille a été mis en évidence pour des champignons appartenant à des genres distincts. En revanche, dans le cas d'un genre donné, aucun polymorphisme de taille n'est observé (Donaldson *et al.* 1995). Schroeder *et al.* (2002) ont utilisé ce gène pour détecter *Ophiostoma piliferum*, agent causant le bleuissement des poutres dans les habitations.

#### *L'analyse de l'ADN Polymorphe Aléatoirement Amplifié (Random Amplified Polymorphic DNA) – RAPD*

La RAPD ou l'analyse d'ADN Polymorphe Aléatoirement Amplifié est une méthode basée sur la PCR utilisant de courtes amorces (environ 10 oligonucléotides). La RAPD permet d'obtenir une empreinte génomique d'une souche par l'utilisation d'une seule amorce qui, en se fixant

au hasard sur plusieurs sites du génome du champignon, va réaliser l'amplification d'un ensemble de fragments d'ADN. Theodore *et al.* (1995) ont révélé un polymorphisme parmi huit isolats de *Serpula lacrymans* en utilisant quatre amorces élémentaires. Schmidt et Moreth (1998a) distingue *S. lacrymans* de *S. himantoides* issus de onze isollements en utilisant au moins dix amorces. La RAPD est une technique rapide si elle est réalisée à partir de culture pure. Cependant quatre amorces au moins sont nécessaires pour obtenir des résultats fiables, cela parce que les amorces courtes impliquent une grande sensibilité à la contamination de l'ADN (Schmidt et Moreth, 1998a).

#### *"Amplified ribosomal DNA Restriction analysis" – ARDRA*

Les profils de restriction obtenus en utilisant l'ARDRA, montrent un polymorphisme chez trois *Heterobasidion annosum* (Kasuga *et al.*, 1993) ; elle se révèle être un outil de diagnostic général pour distinguer clairement les espèces *Serpula lacrymans* de *S. himantoides* (Schmidt et Moreth, 1998b) ; elle permet de différencier les genres *Donkioporia expansa*, *Coniophora puteana*, *Postia placenta* et *Gloeophyllum sepiarium* (Zaremski *et al.*, 1998 ; Schmidt et Moreth, 2000).

#### *"Species-Specific Priming PCR" – PCR, SSPP*

Des amorces élémentaires spécifiques ont été employées pour *Heterobasidion annosum* et *Armillaria ostoyae* (Schulze et Bahnweg, 1998). Jasalavich *et al.* (2000) utilisent des amorces élémentaires détectant n'importe quel champignon présent dans le bois, mais ne peuvent pas l'identifier. Enfin, Moreth et Schmidt (2000), l'utilise comme un outil d'identification fiable pour les pourritures cubiques dégradant les bois d'œuvre.

#### *Séquençage*

Ces dernières années, les séquences nucléotidiques ont fait l'objet de publications de plus en plus nombreuses. Elles ont porté sur des parties diverses du génome et sur des champignons très variés. Cela a permis des avancées en systématique, au niveau des classes comme par exemple chez les Basidiomycètes (Walker et Doolittle, 1982 ; Illingworth *et al.*, 1991 ; Stickwell *et al.*, 1992 ; Swann et Taylor, 1993, 1995 ; Berres *et al.*, 1995 ; Bresinsky, 1996 ; Liu *et al.*, 1997). Berbee et Taylor (1993) focalisent leurs travaux sur l'évolution en utilisant des secteurs relativement stables de l'ADN, comme la petite unité 18S de l'ARN ribosomique. À l'inverse, les sections à évolution plus rapide, comme les espaceurs transcrits en particulier les ITS, sont de plus en plus utilisés pour détecter les parentés, soit au niveau des ordres, familles et des genres (Hibbett et Donoghue, 1995 ; Moncalvo *et al.*, 1995a, 1995b ; Hallenberg *et al.*, 1996 ; Nakasone, 1996 ; Moreth et Schmidt, 2000) , soit au

niveau spécifique (Kasuga *et al.*, 1993 ; Nakasone et Sytsma, 1993 ; Adams et Knopp, 1996). Boidin *et al.* (1998), en comparant 360 séquences d'ITS d'espèces de Basidiomycètes, pour la plupart des Aphyllophorales propose cinq ordres nouveaux : Péniochorales, Phlébiales, Podoscyphales, Tramétales et Vuilleminiales ainsi que cinq familles nouvelles: Acanthophysaceae, Amylostereaceae, Gloiothelaceae, Lophariaceae et Trametaceae.

## **I.6. Conclusion**

En conclusion, nous notons que toutes ces recherches appliquées portent sur la valorisation des connaissances fondamentales acquises sur le rôle des champignons dégradant le bois depuis l'organisation et la structure du bois jusqu'aux relations entre la composition du bois et sa sensibilité aux altérations biologiques. Depuis quelques années des techniques récentes font appel à des connaissances de pointe en biologie moléculaire dans le but de préciser et d'identifier clairement les champignons dégradant les bois en pourriture cubique et fibreuse. Ces outils moléculaires vont permettre d'étudier la diversité et la taxonomie des champignons dégradant le bois en ne se limitant pas qu'aux observations morphologiques, histologiques et anatomiques des basidiomes qui restent incontournables mais fastidieuses. Ainsi, l'étude du polymorphisme de l'ITS de l'ADN ribosomique conduira à l'identification et à la discrimination de la plupart des espèces de champignons lignivores à partir d'un carpophore ou d'une culture pure mycélienne. De plus, cette étude précisera la position taxonomique de ces champignons dans les arbres phylogénétiques et les groupera selon leurs propriétés moléculaires communes (pourriture fibreuse et pourriture cubique). L'objectif de toutes ces recherches est également d'acquérir une meilleure connaissance des principales fonctions impliquées dans le développement, le fonctionnement et l'adaptation à l'environnement des champignons décomposeurs de bois. C'est à l'atteinte de cet objectif que s'attacheront les travaux présentés dans les prochains Chapitres. Ces recherches visent également à l'identification moléculaire d'une espèce fongique sans critère morphologique, c'est-à-dire au premier stade de l'infestation du bois.

## **CHAPITRE II**

**CARACTERISATION DES APHYLLOPHORALES  
DEGRADANT LE BOIS EN POURRITURE CUBIQUE ET  
FIBREUSE.**



## CHAPITRE II : Caractérisation des Aphyllophorales dégradant le bois en pourriture cubique et fibreuse.

### II.1. Introduction

Pour de nombreuses espèces de champignons, un polymorphisme intraspécifique existe, rendant leur identification macroscopique difficile (Debaud *et al.*, 1999). Les marqueurs moléculaires, d'utilisation facile, donnant accès à des informations sur la variabilité, ont favorisé le développement des analyses de diversité des champignons. Pour cette étude portant sur des aphyllophorales dégradant le bois, le problème principal à résoudre consiste à mettre en évidence l'éventuelle existence d'un polymorphisme intraspécifique chez ces champignons afin de compléter et clarifier leur identification. Pour cela, un marqueur idéal doit être indépendant des conditions de milieu, discriminant et neutre (Bruns *et al.*, 1991). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire basées sur la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) développée par Bruns *et al.* (1991) permet l'amplification de portions du génome nucléaire des champignons. Les portions d'ADN les plus utilisées pour les études génétiques des Basidiomycètes (Chapitre I.5) sont situées dans l'opéron ribosomique nucléaire (Gardes *et al.*, 1991 ; Gardes et Bruns, 1993). Chez les Basidiomycètes, ces gènes sont organisés d'au moins 200 copies et d'une longueur d'environ 9 000 paires de bases. Il est formé de trois gènes impliqués dans la structure des ribosomes : 18 S (1 800 paires de bases), 5,8 S (120 paires de bases) et 28 S (3 200 paires de bases) séparés par deux régions non codantes appelées ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Chacune des copies est séparée par une région intergénique IGS (*Inter Genic Spacer*) où dans le cas des Basidiomycètes, un gène ribosomique supplémentaire 5 S s'intercale. Des portions de cet ADN sont sélectionnées pour étudier la diversité à différents niveaux taxonomiques (Bruns *et al.*, 1991). En effet, l'opéron ribosomique contient des portions peu variables permettant des études interspécifiques au niveau des genres et des familles et des portions très variables permettant des études entre des espèces proches ou de diversité intraspécifique (Bruns *et al.*, 1991 ; Hillis *et al.*, 1991).

Le laboratoire de Préservation des Bois du Cirad possède plus de 800 souches de champignons responsables de la détérioration des bois tropicaux et tempérés ; ces souches ont été déterminées pour la plupart entre 1952 et 1982 d'après les caractères morphologiques et anatomiques des sporophores dont elles sont issues. Certaines espèces sont représentées par des dizaines de souches comme *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Donkioporia expansa* et *Spongipellis spumeus* sans qu'il soit possible de savoir si cette multiplicité correspond à une réelle diversité génétique. Il est rapidement apparu que l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure connaissance de ces souches serait très profitable

pour la bonne conservation, la gestion et l'utilisation de ce patrimoine biologique. En effet, les outils moléculaires permettent de travailler à plusieurs niveaux taxinomiques, comprenant les familles, les genres et la variabilité intraspécifique (White *et al.*, 1990 ; Bruns *et al.*, 1991 ; Gardes et Bruns, 1993 ). Pour cela, il est nécessaire de mettre en œuvre différentes méthodes comme l'obtention de mycélium exempt de toute trace d'ADN exogène, la purification par étapes successives de l'ADN, l'amplification par PCR de la séquence ciblée, l'utilisation d'enzymes de restriction capables de couper l'ADN de sorte à générer des profils de restrictions interprétables (Zaremski *et al.*, 1998) et le séquençage des ITS. Les séquences obtenues seront alors comparées avec les séquences des banques de données (NCBI) en utilisant le BLASTn de NCBI. La comparaison avec des séquences présentant des homologies élevées voire totales (variant de 80 à 100%) pourra fournir des indications sur la position taxonomique et la diversité de ces Basidiomycètes (Jasalavich *et al.*, 2000 ; Moreth et Schmidt, 2000 ; Göller *et al.*, 2003).

Ainsi, pour compléter la caractérisation de nos souches et explorer une éventuelle diversité intraspécifique parmi les Basidiomycètes, tous des Aphyllophorales dégradant le bois en pourriture cubique et fibreuse de la collection de souche du Cirad, nous avons choisi d'utiliser la PCR/RFLP et le séquençage de l'ADN.

## **II.2. Matériel et méthodes**

### **II.2.1. Collection de souches du Cirad**

Le département Forêt du Cirad, possède une collection de cultures de champignons qui dégradent le bois (Figure II.1). Cette collection est essentiellement le fruit de récoltes et d'isolements réalisés à l'occasion de déplacements de travail effectués entre 1952 et 1982. Elle rassemble en majorité des cultures de Basidiomycètes lignivores des régions chaudes ; des espèces récoltées en France y ont été intégrées afin d'élargir notre référentiel.

Toutes les identifications ont été réalisées à partir des fructifications récoltées sur le terrain et non sur des caractères cultureux ou des observations morphologiques et anatomiques du seul appareil végétatif.





Figure II.1 : Vue partielle de la collection de souches (Aphyllophorales) du Laboratoire de Préservation des Bois du Cirad

## II.2.2. Matériel biologique

Parmi la collection du Cirad, 98 souches de Basidiomycètes appartenant toutes à l'ordre des Aphyllophorales ont été retenues, leurs principales caractéristiques sont présentées dans le Tableau II.1. Ces Basidiomycètes ont été identifiés selon des critères de classification classiques comme la morphologie ainsi que les caractéristiques physiologiques et biochimiques habituelles. Toutes ces souches ont été choisies pour leur facilité de culture, pour leur représentativité de la diversité de cette collection (pourriture fibreuse ou cubique, champignon de zone tropicale ou tempérée) et de la réalité des attaques fongiques des bois mis en œuvre.

Tableau II.1 : Liste des 98 espèces fongiques étudiées, numéro de référence, origine de la souche et type de pourriture.

Espèces	N�� Réf.	Origine	TP*
<i>Abortiporus biennis</i>	4399	Bois indéterminé, France, 1970	F
<i>Abortiporus biennis</i>	4354	H.D.	F
<i>Amylostereum areolatum</i>	9026	<i>Picea abies</i> , Allemagne, 1978	F
<i>Antrodia serialis</i>	153	Bois indéterminé, Afrique du Sud, 1981	C
<i>Bjerkandera adusta</i>	147	<i>Pterocarpus soyauxii</i> , Cameroun, 1981	F
<i>Cerrena unicolor</i>	3948	<i>Pycnanthus angolensis</i> , Cameroun, 1953	F
<i>Climacocystis borealis</i>	526	H.B.	F
<i>Coniophora puteana</i>	CBS.132.70	C.B.S.	C
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	4033	H.B.	F
<i>Donkioporia expansa</i>	4415	H.B.	F
<i>Donkioporia expansa</i>	3021	H.B.	F
<i>Favolus alveolaris</i>	975	Bois indéterminé, C��te d'Ivoire, 1975	F
<i>Favolus mori</i>	3705	H.B.	F
<i>Fibroporia vaillantii</i>	4491	H.D.	C

<i>Fistulina hepatica</i>	CBS.161.30	C.B.S.	C
<i>Flavodon flavus</i>	5988	H.B.	F
<i>Fomes fomentarius</i>	4549	<i>Betula</i> sp., France, 1970	F
<i>Fomes fomentarius</i>	3470	<i>Quercus</i> sp., France, 1978	F
<i>Fomes fomentarius</i>	4547	H.B.	F
<i>Fomitopsis officinalis</i>	4343	H.B.	C
<i>Fomitopsis officinalis</i>	543	H.D.	C
<i>Fomitopsis pinicola</i>	4311	H.B.	C
<i>Fomitopsis pinicola</i>	4295	H.B.	C
<i>Ganoderma adspersum</i>	4229	H.B.	F
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS 175.30	C.B.S.	F
<i>Ganoderma lucidum</i>	4301	<i>Quercus</i> sp., France, 1982	F
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4361	H.B.	F
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4351	H.B.	F
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4143	H.B.	F
<i>Ganoderma</i> sp.	4356	H.B.	F
<i>Ganoderma</i> sp.	4355	H.B.	F
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	155	<i>Picea</i> sp., France, 1980	C
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	590	H.D.	C
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	CBS.900.73	C.B.S.	C
<i>Hericium coralloides</i>	CBS 206.29	C.B.S.	F
<i>Hericium coralloides</i>	9910	H.B.	F
<i>Heterobasidion annosum</i>	2031	H.B.	F
<i>Heterobasidion annosum</i>	4278	H.B.	F
<i>Hexagonia hydroides</i>	E 749	Bois indéterminé, Guyane, 1982	F
<i>Hexagonia nitida</i>	CBS.212.53	C.B.S.	F
<i>Hexagonia nitida</i>	4419	H.B.	F
<i>Hymenochaete tabacina</i>	701	H.B.	C
<i>Inonotus radiatus</i>	486	H.B.	F
<i>Irpex flavus</i>	1004	H.B.	F
<i>Laetiporus sulphureus</i>	440	H.B.	C
<i>Lenzites betulinus</i>	CBS.102.11	C.B.S.	F
<i>Meripilus giganteus</i>	301	Bois indéterminé, France, 1975	F
<i>Meripilus giganteus</i>	4357	H.D.	F
<i>Merulius tremellosus</i>	6550	Ouvrage hydraulique, France 1978	F
<i>Merulius tremellosus</i>	CBS.217.56	C.B.S.	F
<i>Oligoporus caesius</i>	5921	H.D.	C
<i>Oligoporus caesius</i>	4119	H.D.	C
<i>Oligoporus caesius</i>	4502	H.D.	C
<i>Oligoporus stipticus</i>	332	H.D.	C
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	CBS.298.33	C.B.S.	F
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	4211	Bois indéterminé, Madagascar, 1971	F
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	279	Bois indéterminé, Madagascar, 1971	F
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	365	H.B.	F
<i>Oxyporus</i> sp.	4370	<i>Terminalia superba</i> , France, 1979	F
<i>Perenniporia fraxinea</i>	190	H.D.	F
<i>Perenniporia medulla-panis</i>	4597	<i>Prunus avium</i> , France, 1978	F
<i>Perenniporia subacida</i>	985	Bois indéterminé, Guyane, 1975	F
<i>Perenniporia subacida</i>	549	H.D.	F
<i>Perenniporia subacida</i>	4553	H.D.	F
<i>Phellinus ferreus</i>	3618	<i>Terminalia superba</i> , Côte d'Ivoire, 1975	F
<i>Phellinus pini</i>	202	H.B.	F

<i>Phellinus pomaceus</i>	300	H.D.	F
<i>Phellinus punctatus</i>	3918	H.D.	F
<i>Phellinus torulosus</i>	223	H.D.	F
<i>Phlebiopsis roumeguerei</i>	6570	<i>Quercus</i> , Drôme, 1970	F
<i>Podoscypha bolleana</i>	5430	Bois indéterminé, Côte d'Ivoire, 1967	F
<i>Podoscypha petalodes</i>	4317	Bois indéterminé, Pakistan, 1962	F
<i>Podoscypha ursina</i>	7034	H.B.	F
<i>Polyporus melanopus</i>	900	H.D.	F
<i>Polyporus melanopus</i>	3602	H.D.	F
<i>Polyporus melanopus</i>	182	H.D.	F
<i>Poria placenta</i>	CBS.384.82	C.B.S.	C
<i>Rigidoporus lineatus</i>	1194	<i>Vochysia</i> sp., Guyane, 1982	F
<i>Rigidoporus ulmarius</i>	3027	H.B.	F
<i>Serpula lacrymans</i>	CBS 235.33	C.B.S.	C
<i>Spongipellis spumeus</i>	314	H.D.	F
<i>Spongipellis spumeus</i>	986	H.D.	F
<i>Spongipellis spumeus</i>	4566	H.B.	F
<i>Spongipellis spumeus</i>	988	H.D.	F
<i>Spongipellis spumeus</i>	154	H.D.	F
<i>Spongipellis spumeus</i>	349	H.D.	F
<i>Stereum rugosum</i>	3837	<i>Quercus ilex</i> , Ardèche 1960	F
<i>Stereum sanguinolentum</i>	CBS.529.50	C.B.S.	F
<i>Trametes odorata</i>	4166	H.D.	F
<i>Trametes odorata</i>	166	H.D.	F
<i>Trametes odorata</i>	534	H.D.	F
<i>Trametes pubescens</i>	288	<i>Betula</i> sp., France, 1970	F
<i>Trametes versicolor</i>	171	<i>Fagus sylvatica</i> , France, 1970	F
<i>Trametes versicolor</i>	34671	Bois indéterminé, Portugal, 1969	F
<i>Trametes versicolor</i>	CBS.737.85	C.B.S.	F
<i>Trametes versicolor</i>	32745	<i>Fagus sylvatica</i> , France, 1979	F
<i>Trametes zonatus</i>	287	Bois indéterminé, Madagascar 1970	F
<i>Xylobus frustulatus</i>	4420	H.B.	F

Légende : \* TP : Type de pourriture ; C : cubique ; F : fibreuse ; H.D. : Herbier A. DAVID ; H.B. : Herbier J. BOIDIN ; les Herbiers de A. DAVID et J. BOIDIN se trouvent à la Faculté de Pharmacie de Lyon (France) ; C.B.S. : Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Pays-Bas.

### II.2.3. Production de mycélium

Pour chaque souche, des repiquages successifs ont été réalisés par bouturage végétatif. Les mycéliums ont été produits en culture pure en boîte de Pétri sur milieu de culture gélosé (malt 4%, agar 2%) recouvert d'une membrane de cellophane. Les champignons sont mis en culture à 22°C à l'obscurité dans des boîtes de Pétri scellées avec du ruban adhésif. Le temps de croissance est variable d'une souche à l'autre (il faut en général 3 semaines pour que le mycélium du champignon recouvre la totalité de la surface du milieu de culture). Le mycélium est alors prélevé aseptiquement sous hotte à flux laminaire. Il faut prendre soin d'éliminer toutes traces de milieu de culture (notamment l'implant de culture) et faire attention car certains champignons dégradent partiellement le film de cellophane. Les mycéliums sont



ensuite transférés dans l'azote liquide puis conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le mycélium peut ainsi être conservé plusieurs années pour des analyses moléculaires.

## **II.2.4. Études moléculaires**

### **II.2.4.1. Extraction de l'ADN total**

L'extraction de l'ADN à partir des mycéliums congelés a été réalisée à l'aide du kit de purification de l'ADN pour végétaux supérieurs DNeasy distribué par la société Qiagen.

Dix à 40 mg de mycélium ont été prélevés dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. On y a ajouté 50 mg de sable de Fontainebleau stérilisé 20 min à  $120^{\circ}\text{C}$  pour améliorer le broyage. Le mycélium est broyé à l'aide d'un micropilon (Piston Pellet). Puis 400  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse AP1 et 4  $\mu\text{l}$  de RNase A (100 mg/ml) sont ajoutés. La suspension est vortexée puis incubée au bain-marie à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min. Cette étape entraîne la destruction des membranes, l'éclatement des noyaux et donc la libération de l'ADN, mais aussi de tous les autres composés cellulaires.

Cent trente  $\mu\text{l}$  de tampon de déprotéinisation AP2 sont ajoutés. La suspension est vortexée, incubée dans la glace pendant 5 min puis centrifugée 5 min à 14 000 rpm. Les protéines, les polysaccharides et les détergents précipitent. Une étape de centrifugation a été ajoutée pour éviter que la viscosité et la quantité de précipité ne viennent saturer la membrane de la colonne QIAshredder.

Le lysat est transféré sur une colonne de filtration QIAshredder (450  $\mu\text{l}$ ) puis centrifugé 2 min à 14000 rpm. Les débris cellulaires et le précipité sont éliminés.

Le surnageant est repris par 225  $\mu\text{l}$  de tampon AP3 ; l'ADN précipite. Le tampon AP3, par sa salinité, favorise la liaison de l'ADN à la colonne DNeasy mini spin.

Le mélange est transféré par fraction de 650  $\mu\text{l}$  sur une colonne DNeasy mini spin et centrifugé 1 min à 8000 rpm. L'ADN est fixé sur la colonne. Le filtrat est jeté. On a renouvelé cette opération pour utiliser la totalité du matériel.

Ensuite 500  $\mu\text{l}$  de tampon de lavage AW sont ajoutés et le tube est centrifugé 1 min à 14000 rpm. Cette étape est répétée en jetant le filtrat à chaque fois. Ces étapes de lavage permettent de rincer puis de sécher la colonne. Le tampon AW comprend de l'éthanol qui permet d'éliminer les impuretés, notamment les sels, les protéines et les polysaccharides.

La colonne est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 2 ml (collection tube). L'ADN est élué par 60  $\mu\text{l}$  de tampon d'éluion AE préchauffé à  $65^{\circ}\text{C}$ . Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 5 min avant d'être centrifugés 1 min à 8000 rpm. Cette étape est répétée en ajoutant 40  $\mu\text{l}$  de tampon AE également préchauffé de sorte à obtenir un volume final de 100  $\mu\text{l}$  de solution d'ADN qui sont conservés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

À l'issue de la phase d'extraction de l'ADN, la concentration et la pureté de l'extrait sont évaluées en mesurant l'absorbance à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le rapport d'absorbance doit être compris entre 1,7 et 1,9 pour travailler ultérieurement de façon reproductible.

#### **II.2.4.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

##### **II.2.4.2.1. Principe**

C'est une réaction enzymatique en chaîne qui permet l'amplification d'une région spécifique de l'ADN. Elle a été décrite initialement par Mullis (1987). La PCR utilise deux oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) qui servent d'amorce à une enzyme la Taq DNA polymérase thermostable qui utilise des dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP) comme substrat.

La PCR est un ensemble de cycles thermiques répétés  $n$  fois :

*La dénaturation* : Elle s'effectue par chauffage, au-dessus de la température de fusion ( $T_m$ ) de l'ADN. Elle provoque la rupture des liaisons non covalentes établies entre les bases (3 liaisons hydrogène entre G-C et 2 entre A-T). On obtient un ADN simple brin orienté 3'-5'.

*L'hybridation* : La température est abaissée progressivement sous la  $T_m$ . Dans ces conditions, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires. Les deux amorces sont placées de part et d'autre de la région à amplifier. La distance entre les deux amorces définit la taille de la région amplifiée.

*L'extension* : Les oligonucléotides servent d'amorce à la Taq Polymérase qui synthétise un brin complémentaire du brin matriciel en intégrant spécifiquement les dNTPs complémentaires correspondants.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ L contenant 2  $\mu$ L de matrice d'ADN (50 ng d'ADN), 2,5  $\mu$ L de tampon 10 X, 0,75  $\mu$ L de tampon  $MgCl_2$  (25 mM), 1  $\mu$ L de chaque amorce (20 pmol/ $\mu$ L), 0,125  $\mu$ L de Taq polymérase et de l'eau pour compléter jusqu'à 25  $\mu$ L.

Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et les tampons. Les PCR sont effectuées avec un thermocycleur Perkin Elmer Applied Biosystems : GenAmp PCR system 9700 ou 2400.

##### **II.2.4.2.2. Application aux ITS**

Les régions ITS de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorce spécifique des champignons : ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), (White *et al.*, 1990 ; Gardes et Bruns, 1993). Les

températures et temps appliqués à la réaction de PCR et notamment aux 30 cycles d'amplification sont présentés Figure II.2.

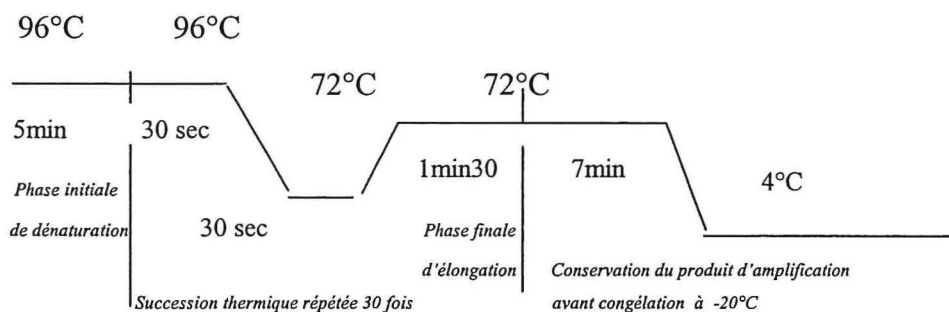


Figure II.2 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de PCR appliqué à l'amplification des ITS de champignons.

#### II.2.4.2.3. Purification sur gel des fragments d'ADN

Les produits de PCR obtenus appelés amplifiats sont purifiés de la façon suivante : on dépose 25 µl d'amplifiats mélangés avec 8 µl de bleu de charge (glycérol 30 %, bleu de bromophénol 0,25 %, EDTA 10mM, à pH 8) dans les puits d'un gel d'agarose à 1 % contenant 2 gouttes de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml.

La migration s'effectue sous une tension de 120 Volts pendant 30 min dans un tampon d'électrophorèse TAE 1X. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Smart Ladder (Eurogentec). Il permet d'estimer la taille et la concentration des amplifiats.

Les bandes d'acides nucléiques marquées au BET sont alors visualisées sous UV. En effet, le BET comporte un groupement qui s'intercale entre les plans de bases successives des chaînes polynucléotidiques et la fluorescence à 590 nm de l'ADN plus intense pour le groupement intercalé permet sa visualisation.

#### *Purification des fragments d'ADN sur gel*

Après migration sur gel d'agarose, les bandes à séquencer sont découpées sous UV au scalpel et chaque bande découpée est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Puis les fragments d'ADN sont extraits puis purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction (Qiagen, France).

Trois volumes de solution QG pour 1 volume (masse) de fragment de gel sont ajoutés (le poids en mg correspond à 1 volume de gel). Les tubes sont mis à incuber au bain marie à 50°C pendant 10 min. Ils sont vortexés 2 à 3 fois pendant l'incubation pour mieux dissoudre le gel.

Le tampon QG contient un indicateur coloré de pH. Il faut vérifier que la couleur du mélange soit jaune car l'absorption de l'ADN sur la membrane est efficace seulement à pH < 7,5.

Un volume d'isopropanol pur est ajouté pour augmenter le rendement de la purification puis vortexé. Le mélange est transféré dans une colonne QIAquick spin puis centrifugé 1 min à 14000 rpm. L'ADN s'adsorbe sur la colonne. Le filtrat est jeté.

Cinq cents  $\mu$ l de tampon QG sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm pour éliminer toutes traces d'agarose. Le filtrat est jeté.

Sept cent cinquante  $\mu$ l de solution PE sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm, le filtrat est jeté. On recommence cette étape, mais avec 250  $\mu$ l de solution PE. Le tampon PE, contenant de l'éthanol, est utilisé pour laver la colonne : les primers, les impuretés (sels, Taq polymérase, agarose, nucléotides non incorporés, le BET) sont éliminés.

La colonne est séchée en centrifugeant 1 min à 14000 rpm ce qui permet d'éliminer la solution PE qui pourrait interférer dans les étapes suivantes.

La colonne est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. L'ADN est élué avec 30  $\mu$ l de solution d'éluion EB après une incubation de 1 min à température ambiante et une centrifugation de 2 min à 14000 rpm. L'ADN est au fond du tube et est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La concentration d'ADN de l'extrait est quantifiée (5  $\mu$ l d'extrait déposés avec 5  $\mu$ l de bleu de charge) par comparaison des bandes avec le marqueur (5  $\mu$ l de Smart Ladder) par migration sur gel d'agarose 1 % (120 Volts pendant 20 min). Cette quantification permettra ultérieurement d'ajuster la concentration d'ADN pour la réaction de séquence.

#### **II.2.4.3. Le polymorphisme de restriction (RFLP)**

Les réactions de digestion des ITS sont réalisées avec 15  $\mu$ l d'amplifiat et 5  $\mu$ l d'un mélange de 2,5  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pure, 2  $\mu$ l d'un réactif correspondant à l'enzyme et 5 unités d'enzyme. Ces réactions sont réalisées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit avec les enzymes AluI (5'AG<sup>^</sup>CT3'), Sau96 (5'G<sup>^</sup>GNCC3') et 1 heure à  $60^{\circ}\text{C}$  pour TaqI (5'T<sup>^</sup>CGA3').

Pour chacune des étapes décrites ci-après (purification de l'ADN, amplification de l'ITS et digestion de l'ITS par différentes enzymes de restriction), l'ADN obtenu est visualisé sous UV après électrophorèse en gel d'agarose qui contient du bromure d'éthidium (BET) à  $2\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les gels de contrôle sont réalisés dans du TBE 1X avec différents types d'agarose et différentes conditions de migration suivant les cas (Annexe 2).

Les dépôts dans les puits des différents gels ont été réalisés avec 13  $\mu$ l d'un mélange composé de 10  $\mu$ l de la solution (ADN purifié, produits PCR ou produits de digestion de l'ADN amplifié) et 3  $\mu$ l de tampon de charge (bleu de bromophénol, glycérol 87%, EDTA 0,5M, xylène cyanol FF). Les marqueurs de poids moléculaire VIII et XIII (Boehringer Mannheim) sont placés de part et d'autre du gel afin d'estimer le nombre de paires de base des fragments obtenus.

#### **II.2.4.4. Le séquençage**

##### **II.2.4.4.1. Principe**

Le séquençage se fait par une méthode automatique d'analyse de séquence de l'ADN basée sur une détection de la fluorescence. La réaction de séquence, dite méthode de Sanger, consiste en la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire d'une matrice d'ADN simple brin, terminée par un nucléotide « terminator » portant une fluorescence. Les brins d'ADN sont séparés en fonction de leur taille dans le capillaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide haute résolution. Le voltage appliqué dans chaque tube de réaction est de 2,5Kv. Les brins les plus petits sont les premiers à migrer. Les bandes sont repérées lors de leur passage au niveau du système de détection par un faisceau laser, et un jeu de filtres est alors utilisé pour les différencier d'après leur spectre d'émission.

La réaction de séquence est réalisée à l'aide du kit Perkin Elmer ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction. L'initiation de la réaction de synthèse est obtenue en fixant en 5' de la matrice une amorce oligonucléotidique complémentaire. La réaction d'élongation est catalysée par une Ampli Taq DNA Polymerase qui requiert la présence des 4 dNTPs. La méthode dépend également de la présence en quantité limitante de didesoxyribonucléotides (ddNTPs) qui sont incorporés à la place des dNTPs. Les didésoxynucléotides incorporés sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes. Les ddNTPs diffèrent des dNTPs par l'absence de groupe  $3'OH$  nécessaire à l'élongation par la Taq polymérase. Quand un ddNTP est incorporé à la nouvelle molécule d'ADN simple brin, l'absence de groupe hydroxyle empêche la formation de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant, c'est un terminateur de chaîne. L'incorporation des ddNTPs en quantité limitante engendre toute une série de fragments de différentes longueurs. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse. Un système optique laser détecte la fluorescence portée par le fragment ; on obtient un électrophorégramme de spectre d'émission. Un logiciel d'analyse permet de faire la correspondance entre les courbes de fluorescence et le nucléotide incorporé ; l'ordre de lecture étant par définition, l'ordre de la séquence.

##### **II.2.4.4.2. La réaction de séquence**

Le mélange de la réaction de séquence comprend : 1 µl d'amorce à 3,2 pmoles d'ITS1-myc ou 1 µl d'amorce à 3,2 pmoles d'ITS4-myc ; 4 µl de Mix (solution de réaction comprenant les ddNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase, FS, rTth pyrophosphatase,  $MgCl_2$ ) et 2 µl de tampon 5X (Tris-HCl 400 mM,  $MgCl_2$  10 mM ; pH 9). Pour chaque réaction de séquence, on utilise une quantité de 50 ng de produit de PCR. Le volume total de la réaction est ajusté à 20µl avec



de l'eau stérile. Les paramètres du cycle de la réaction de séquençage comprenant 30 cycles d'amplification sont présentés Figure II.3

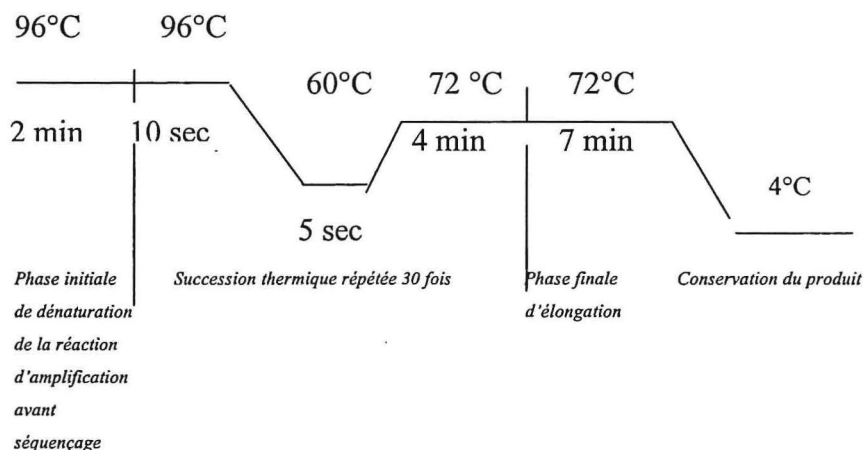


Figure II.3 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de réaction de séquences des ITS de champignons.

#### II.2.4.4.3. Purification des produits des réactions de séquence et séquençage

Les produits des réactions de séquence sont repris par 2 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 50 µl d'éthanol à 95°C dans des tubes Eppendorfs ce qui précipite les réactions de séquence, mais pas les ddNTPs. Les tubes contenant ces produits de réaction de séquence précipités sont vortexés puis incubés pendant 10 min à température ambiante. Après une centrifugation de 30 min à 14000 rpm à 20°C, le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec 250 µl d'éthanol 70 %. Après une centrifugation de 30 min à 14000 rpm à 20°C, l'éthanol est enlevé et le culot est séché à l'air libre pendant au moins 30 min.

À cette étape, on peut congeler le culot à -20°C ou le reprendre avec 25 µl de Template Suppression Reagent. Le culot est dénaturé à chaud (4 min à 120°C) puis refroidi dans la glace pendant 4 min. Cette dénaturation est alors irréversible. Les tubes sont vortexés puis centrifugés brièvement. Enfin, ces 25 µl de produit de séquence soient transférés dans les tubes spéciaux pour le séquenceur.

Les fragments d'ADN sont séparés suivant leur taille dans un capillaire par électrophorèse en continu sur gel de polyacrylamide à 2,5 kV. Les brins les plus petits sont les premiers à migrer. La lecture se fait en temps réel après excitation des fluorochromes par un faisceau laser situé à la fin du capillaire. La fluorescence qui en résulte est recueillie par un capteur et les pics de fluorescence sont analysés. Le programme d'utilisation du séquenceur Perkin Elmer est le logiciel ABI Prism 310. Le programme d'utilisation des données brutes est le logiciel Sequence Analysis PE ABI.

#### II.2.4.4.4. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – *BLAST*

Le *BLAST*, *Basic Local Alignment and Search Tool*, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). En février 2004, plus de trente-deux millions de séquences (32549400) étaient disponibles dans les bases de données de NCBI ; ce nombre s'accroît notamment avec le développement des programmes de comparaison de séquences. Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997). BLAST utilise les matrices de comparaison entre acides nucléiques ou protéines, comme BLOSUM (Henikoff et Henikoff, 1992) pour évaluer la pertinence de ces alignements et calcule un score de « vraisemblance » à l'alignement obtenu. Le score de « vraisemblance » qualifie et quantifie la similitude entre les séquences (Risler *et al.*, 2003). Celui-ci peut mesurer soit le rapprochement, soit l'éloignement des séquences pour refléter ce qui les sépare. Ce critère qui permet déjà d'établir des ressemblances ne suffit pas toujours pour révéler au mieux les similitudes entre séquences. Très rapidement, on s'est aperçu qu'une insertion ou une délétion d'une ou plusieurs bases pouvait améliorer le score d'une comparaison et ainsi faire davantage ressortir les zones identiques ou très proches (Risler *et al.*, 2003). Ces brèches (en anglais gap) que l'on impose aux séquences sont évidemment pénalisantes dans le calcul du score.

Dans notre étude, après avoir obtenu et corrigé les séquences à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel Sequence Navigator puis, après les avoir assemblées avec le logiciel Autoassembleur (front et reverse), nous effectuerons des BLASTn (Nucléotide) sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

#### Les critères de ressemblance

À un alignement donné est toujours associé un score. Les programmes d'alignement, quels qu'ils soient, cherchent toujours à maximiser ce score. Nous pouvons penser que plus le score est grand, plus l'alignement est significatif. Ce raisonnement est valide si l'on s'intéresse à une famille homogène où toutes les séquences ont à peu près la même longueur : dans ce cas

plus le score est élevé, plus la ressemblance est grande, ce qui ne nous dit pas cependant si elle est significative (Risler *et al.*, 2003). Dans notre étude, plutôt que d'utiliser les scores nous allons utiliser les pourcentages d'identités ou de similarités entre deux séquences et nos critères de vraisemblance seront les suivants :

- 1- Si les séquences les plus proches extraites des banques de données possèdent plus de 90% de similarité et si ces séquences donnent le même nom de genre et d'espèce, le résultat obtenu est conforme à notre identification initiale basée sur les critères morpho-anatomiques pour le genre et pour l'espèce. Dans ce cas de figure, nous analyserons les différences dans les régions du génome : ITS1, 5,8S et ITS2 ; ces différences sont obtenues après avoir réalisé un alignement sous CLUSTAL pour chacune de nos séquences avec la séquence de référence extraite de NCBI qui a été trouvée la plus proche en terme de similarité après BLAST. Pour une bonne comparaison des résultats et après le repérage du 5,8S, nous utiliserons des bandes d'ITS de longueur identique, c'est-à-dire les 180 bases de l'ITS1 qui précèdent le 5,8S, et les 215 bases faisant suite à ce 5,8S.
- 2- Si les séquences possèdent plus de 90% de similarité et si ces séquences ne donnent que le nom du genre à l'identique, le résultat obtenu est conforme à notre identification initiale selon les critères morpho-anatomiques pour le genre. Dans ce cas de figure, nous noterons pour chacune de nos séquences la ou les régions où le BLAST a été réalisé avec le maximum de similarité.
- 3- Si les séquences possèdent plus de 90% de similarité et si ces séquences ne donnent ni le nom du genre et ni le nom de l'espèce attendue selon notre identification initiale basée sur les critères morpho-anatomiques, on aura alors quatre cas de figure :
  - a) Une mauvaise identification réalisée au départ selon les critères morpho-anatomiques classiques ;
  - b) Une contamination (Ascomycète) ;
  - c) Un autre champignon voir un nouveau champignon (ce cas sera alors analysé dans le chapitre III) ;
  - d) Un artefact dû soit à la sensibilité de la méthode se révélant peu résolutive dans ce cas là soit à un transfert de gène (ce cas sera examiné dans ce chapitre).

### **Constitution d'un fichier de séquences de référence**

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches seront extraites des banques de données NCBI. Elles constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour nos études taxonomiques et phylogénétiques développées dans le Chapitre III.

## II.3. Résultats

### II.3.1. Amplification des ITS et analyse du polymorphisme de restriction - *RFLP*

La longueur des fragments amplifiés a pu être estimée pour 88 amplifiats d'ITS obtenus sur 98 souches étudiées (Tableau II.2). Dix souches n'ont pas pu être amplifiées ; celles-ci présentent un produit coloré après l'extraction de l'ADN. Ces souches sont les suivantes : *Bjerkandera adusta*, *Flavodon flavus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, *Oligoporus caesius*, *Phellinus pomaceus*, *Poria placenta*, *Trametes versicolor*, *Trametes zonatus* et *Xylobolus frustulatus*.

L'évaluation du nombre de paires de bases des ITS pour les différentes souches met en évidence des ITS d'une longueur comprise entre 560 et 895 pb. Quarante-cinq pour cent des ITS étudiés ont une longueur comprise entre 600 et 650 pb, 16 % entre 650 et 675 pb et 17 % entre 725 à 750 pb. Les 20 % de souches restantes se répartissent assez régulièrement, en dehors des classes précitées, entre 550 et 895 pb pour la longueur de leur ITS.

Au sein d'une même espèce nous avons constaté des différences de poids moléculaires de 40 à 100 paires de bases. Ces différences correspondent à une marge d'erreur de l'ordre de 12% dans la lecture des poids moléculaires des molécules d'ADN sur gel d'agarose.

Le tableau II.2 présente seulement la somme des paires de bases des fragments obtenus pour chaque souche par les enzymes de restriction *TaqI*, *Sau96A* et *AluI*. Cette somme a été obtenue en additionnant la multitude de fragments d'ADN de tailles variables générés par digestion enzymatique puis séparés sur gel d'agarose. Les caractéristiques de tous ces résultats qui ne figurent pas dans cette thèse ont déjà été présentés et sont largement détaillés dans des articles de synthèse (Zaremski *et al.*, 1998 ; Zaremski, 1999). A ce jour, toutes ces données constituent une banque de profils de restriction par souche et par enzyme de restriction.

La somme des nombres de paires de bases des fragments de chaque profil de restriction permet d'identifier trois situations (Tableau II.2) :

- a) La somme des nombres de paires de bases des fragments est égale au nombre de paires de bases du produit de PCR non digéré cela concerne 6 % des souches ;
- b) La somme des nombres de paires de bases des fragments est inférieure au nombre de paires de bases du produit de PCR non digéré ; cela concerne 54 % des souches ;
- c) La somme des nombres de paires de bases des fragments est supérieure au nombre de paires de bases du produit de PCR non digéré : cela concerne 24 % des souches.

Par ailleurs, nous notons que 16 % des souches n'ont pas subi de coupure par les enzymes de restriction.

Tableau II.2 : Numéro de référence de la souche, espèce, nombre de paires de bases des ITS amplifiés (88 souches) et sommes des nombres de paires de bases des fragments obtenus pour chaque souche avec les enzymes de restriction TaqI, Sau96A et AluI. Les souches qui n'ont pas subi de coupure par les enzymes de restriction sont notées nd (nd : non digéré).

N° Référence de la souche	Espèce	Somme des fragments obtenus avec les enzymes			npb de l'ITS
		Taq I	Sau 96A	Alu I	
4354	<i>Abortiporus biennis</i>	663	790	712	725
4399	<i>Abortiporus biennis</i>	498	345	600	625
9026	<i>Amylostereum areolatum</i>	456	640	600	600
153	<i>Antrodia serialis</i>	601	420	908	640
3948	<i>Cerrena unicolor</i>	638	735	650	705
526	<i>Climacocystis borealis</i>	1586	759	1112	640
CBS 132.70	<i>Coniophora puteana</i>	nd	nd	nd	740
4033	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	472	370	540	560
4415	<i>Donkiopora expansa</i>	1709	735	580	585
3021	<i>Donkiopora expansa</i>	552	565	360	625
975	<i>Favolus alveolaris</i>	468	630	364	685
3705	<i>Favolus mori</i>	498	620	490	625
4491	<i>Fibroporia vaillantii</i>	724	970	789	655
CBS 161.30	<i>Fistulina hepatica</i>	871	nd	1354	895
4549	<i>Fomes fomentarius</i>	607	715	600	660
4547	<i>Fomes fomentarius</i>	775	665	800	650
4343	<i>Fomitopsis officinalis</i>	632	670	635	685
543	<i>Fomitopsis officinalis</i>	nd	635	600	625
4311	<i>Fomitopsis pinicola</i>	nd	nd	nd	665
4295	<i>Fomitopsis pinicola</i>	470	490	550	605
4229	<i>Ganoderma adspersum</i>	nd	510	364	740
CBS 175.30	<i>Ganoderma applanatum</i>	nd	nd	nd	580
4301	<i>Ganoderma lucidum</i>	576	976	416	640
4361	<i>Ganoderma resinaceum</i>	576	680	344	725



4351	<i>Ganoderma resinaceum</i>	542	1280	960	710
4355	<i>Ganoderma</i> sp.	nd	nd	nd	625
4356	<i>Ganoderma</i> sp.	nd	840	nd	615
155	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	601	660	780	635
590	<i>Gloeophyllum odoratum</i>	912	680	505	640
CBS 900.73	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	576	nd	1180	640
CBS 206.29	<i>Hericium coralloides</i>	457	670	640	635
9910	<i>Hericium coralloides</i>	nd	450	600	610
4278	<i>Heterobasidion annosum</i>	nd	490	nd	625
2031	<i>Heterobasidion annosum</i>	539	nd	830	640
E 749	<i>Hexagonia hydnoidea</i>	591	660	436	675
4419	<i>Hexagonia nitida</i>	594	525	478	705
CBS 212.53	<i>Hexagonia nitida</i>	562	1380	600	655
701	<i>Hymenochaete tabacina</i>	467	720	550	565
486	<i>Inonotus radiatus</i>	nd	nd	nd	765
1004	<i>Irpex flavus</i>	nd	350	600	615
440	<i>Laetiporus sulphureus</i>	900	nd	930	615
CBS 102.11	<i>Lenzites betulinus</i>	535	345	623	610
301	<i>Meripilus giganteus</i>	599	260	740	635
4357	<i>Meripilus giganteus</i>	966	685	1025	645
6550	<i>Merulius tremellosus</i>	590	nd	635	685
CBS 217.56	<i>Merulius tremellosus</i>	841	560	755	780
5921	<i>Oligoporus caesius</i>	nd	180	860	745
4119	<i>Oligoporus caesius</i>	634	485	594	725
332	<i>Oligoporus stipticus</i>	446	375	466	640
CBS 298.33	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	578	nd	nd	705
279	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	579	720	416	640
365	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	596	nd	nd	655
4211	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	580	780	740	640
4370	<i>Oxyporus</i> sp.	630	650	1100	740
190	<i>Perenniporia fraxinea</i>	550	1270	1000	625
4597	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	565	670	nd	640
4553	<i>Perenniporia subacida</i>	556	624	nd	675
549	<i>Perenniporia subacida</i>	356	1260	580	665

985	<i>Perenniporia subacida</i>	523	645	850	635
3618	<i>Phellinus ferreus</i>	nd	640	530	650
202	<i>Phellinus pini</i>	494	715	1270	710
3918	<i>Phellinus punctatus</i>	344	nd	650	750
223	<i>Phellinus torulosus</i>	568	680	590	655
6570	<i>Phlebiopsis roumeguerei</i>	222	520	630	640
5430	<i>Podoscypha bolleana</i>	583	595	1283	810
4317	<i>Podoscypha petalodes</i>	1234	650	640	670
7034	<i>Podoscypha ursina</i>	528	720	800	745
182	<i>Polyporus melanopus</i>	401	nd	nd	735
900	<i>Polyporus melanopus</i>	488	360	612	690
3602	<i>Polyporus melanopus</i>	655	750	475	740
1194	<i>Rigidoporus lineatus</i>	603	650	960	600
3027	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	425	380	600	600
CBS 235.33	<i>Serpula lacrymans</i>	586	705	1150	670
986	<i>Spongipellis spumeus</i>	617	705	640	715
349	<i>Spongipellis spumeus</i>	572	435	620	725
988	<i>Spongipellis spumeus</i>	441	855	540	565
314	<i>Spongipellis spumeus</i>	511	485	750	640
154	<i>Spongipellis spumeus</i>	nd	600	640	650
4566	<i>Spongipellis spumeus</i>	545	600	790	755
3837	<i>Stereum rugosum</i>	nd	385	600	615
CBS 529.50	<i>Stereum sanguinolentum</i>	479	685	650	660
4166	<i>Trametes odorata</i>	622	nd	612	665
166	<i>Trametes odorata</i>	nd	575	nd	740
534	<i>Trametes odorata</i>	532	320	577	740
288	<i>Trametes pubescens</i>	568	535	410	615
171	<i>Trametes versicolor</i>	401	555	357	640
CBS 737.85	<i>Trametes versicolor</i>	411	345	590	625
34671	<i>Trametes versicolor</i>	423	600	940	725

---

### II.3.2. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Sur les 88 amplifiats obtenus, 53 ont permis l'obtention de séquences nucléotidiques « front et reverse » interprétables (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Liste des 53 souches séquencées et leur numéro de référence

Espèces	Numéro de référence
<i>Cerrena unicolor</i>	3948-1 ; 3948-2
<i>Climacocystis borealis</i>	526
<i>Coniophora puteana</i>	CBS 132-70
<i>Donkioporia expansa</i>	3021 ; 4415
<i>Favolus alveolarius</i>	975
<i>Fibroporia vaillantii</i>	4491
<i>Fomes fomentarius</i>	3470 ; 4549
<i>Fomitopsis officinalis</i>	4343
<i>Fomitopsis pinicola</i>	4295 ; 4311
<i>Ganoderma applanatum</i>	175.30
<i>Ganoderma lucidum</i>	4301
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4143 ; 4351 ; 4361
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	155
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	900.73
<i>Heterobasidion annosum</i>	2031
<i>Hexagonia nitida</i>	212.53 ; 4419
<i>Inonotus radiatus</i>	486
<i>Laetiporus sulphurous</i>	440
<i>Lenzites betulina</i>	102.11-1 ; 102.11-2
<i>Meripilus giganteus</i>	4357
<i>Oligoporus stipticus</i>	332
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	279 ; 365 ; 4211
<i>Oxyporus</i> sp.	4370
<i>Perenniporia fraxinea</i>	190
<i>Perenniporia medulla-panis</i>	4597-1 ; 4597-2
<i>Perenniporia subacida</i>	985
<i>Phellinus pini</i>	202
<i>Phellinus pomaceus</i>	300
<i>Phellinus torulosus</i>	223-2
<i>Phlebiopsis roumeguerei</i>	6570
<i>Podoscypha petalodes</i>	4317
<i>Podoscypha ursina</i>	7034
<i>Spongipellis spumens</i>	314; 986; 988; 4566
<i>Stereum rugosum</i>	3837
<i>Stereum sanguinolentum</i>	CBS 529.50
<i>Trametes odorata</i>	4166 ; 534
<i>Trametes versicolor</i>	171 ; 3467-1

Après le séquençage, nous obtenons 53 séquences nucléotidiques ayant des longueurs d'ITS comprises entre 555 et 653 pb. Nous mettons en évidence des différences de longueur d'ITS d'environ 10 pb dans certains genres tels que *Cerrena*, *Trametes*, *Oxyporus*, *Ganoderma* et *Phellinus*. Ces résultats confirment ceux obtenus après la PCR/RFLP pour certaines souches en particulier pour les genres : *Fomes*, *Ganoderma*, *Heterobasidion*, *Meripilus*, *Oxyporus*, *Perenniporia*, *Polyporus*, *Spongipellis* et *Trametes*. Cette marge d'erreur peut être utilisée comme un outil de différenciation et de discrimination entre nos souches. En effet, le séquençage automatique reste une méthode reproductible alors que la PCR/RFLP reste une méthode qualitative et peu fiable si l'on veut comparer des longueurs d'ITS (estimation des poids moléculaires après visualisation des gels d'agarose).

Après BLAST nous observons les résultats suivants : 49% de ces séquences possédant plus de 90% de similarité sur plus de 80% de leur longueur ont donné le même genre de champignon identifié selon les méthodes morpho-anatomiques (Tableau II.4 et II.5) ; 21% des séquences n'ont pas donné le même nom de champignon (Tableau II.6) et 30% ont révélé des Ascomycètes indiquant une contamination de la souche.

Dans les Tableaux II.4, II.5 et II.6, sont présentées les recherches de similarité de nos séquences, à l'exception de celles qui présentent des contaminations avec les séquences des banques de données. Dans ces tableaux figurent le nom de la souche étudiée, son numéro de référence, le nombre de paires de bases de chacune de ces séquences (npb) et la longueur de la séquence qui a été comparée par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèses.

Dans le Tableau II.4, nous présentons également le nombre de différences obtenues après la réalisation des alignements sous CLUSTAL dans les différentes régions du génome : ITS1, 5,8S et ITS2. Nous observons à peu près au total le même nombre de différences dans les régions ITS1 et ITS2 : cinquante-cinq différences concernent l'ITS2 contre 53 pour ITS1. Dans la région 5,8S seulement 8 différences y ont été observées.

Nous notons que les différentes espèces de *Gloeophyllum* et d'*Oxyporus* présentent très peu de différences dans les régions ITS1 et ITS2 et aucune dans la région du 5,8S.

Ces alignements ont révélé les motifs du début du 5,8S : CAACTTTCA et de la fin du 5,8S qui est TTTGAGTGTCAT et nous avons estimé sa longueur d'environ 154pb.

Tableau II.4 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche. Dans ce tableau figurent le nom de la souche étudiée, son numéro de référence, le nombre de paires de bases de la séquence amplifiée (npb), la longueur de séquence utilisée pour la comparaison par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèses et le nombre de différences obtenues après la réalisation des alignements sous CLUSTAL dans les différentes régions du génome : ITS1, 5,8S et ITS2.

Nom de la souche	N° référence labo	npb	Identité BLAST longueur séquence et %	Nombre de différence		
				ITS1	5,8S	ITS2
<i>Fibroporia vaillantii</i>	4491	616	600/602 (99%)	1		1
<i>Donkioporia expansa</i>	4415	588	582/589 (98%)	2		5
<i>Favolus alveolarius</i>	975	608	520/534 (97%)	10	1	2
<i>Fomes fomentarius</i>	4549	620	519/542 (95%)	15	1	17
<i>Fomitopsis pinicola</i>	4295	623	590/594 (99%)	2		2
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	900-73	571	570/571 (99%)	1		
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	155	575	571/575 (99%)	3	1	
<i>Heterobasidion annosum</i>	2031	591	575/587 (97%)	8		4
<i>Laetiporus sulphureus</i>	440	562	551/552 (99%)			1
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	365	592	574/577 (99%)	1		2
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	279	590	574/575 (99%)	1		
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	4211	610	574/578 (99%)			4
<i>Perenniporia fraxinea</i>	190	582	572/582 (98%)	3		7
<i>Perenniporia subacida</i>	985	620	605/612 (98%)	3	1	3
<i>Stereum sanguinolentum</i>	529-50	569	561/571 (98%)	2	4	4
<i>Trametes versicolor</i>	3467	577	567/571 (98%)	1		3
<i>Total du nombre de différence après alignement sous CLUSTAL</i>				53	8	55

Dans les Tableaux II.5 et II.6 nous avons noté les régions de l'ADN (ITS1, 5,8S et ITS2) dans lesquelles ont été réalisées les comparaisons. La ou les région(s) concernée(s) sont signalées par une croix.

Les résultats présentés dans le Tableau II.5 indiquent que 50% des comparaisons ont été effectuées sur la totalité du fragment amplifié (ITS1, 5,8S et ITS2), que 20% ont été effectuées avec les parties ITS1 et 5,8S, que 10% ont été effectuées uniquement avec la portion 5,8S et que 20% ont été effectuées uniquement avec la partie ITS1 de la séquence.



Tableau II.5 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné le même genre de champignon pour la séquence la plus proche. Dans ce Tableau figurent le nom de la souche étudiée, son numéro de référence, le nombre de paires de bases de la séquence amplifiée (npb), la longueur de la séquence utilisée pour la comparaison par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèse, le genre et l'espèce de la séquence la plus proche notés entre parenthèses. La ou les région(s) de l'ADN (ITS1, 5,8S et ITS2) qui ont été comparées par BLAST sont signalées par une croix.

Nom de la souche	N° Référence labo	npb	Identité BLAST Longueur séquence et %	ITS1	5,8S	ITS2
<i>Fomitopsis officinalis</i>	4343	624	185/188 (98%)			X
(F.sp)						
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4143	645	583/601 (96%)	X	X	X
( <i>Ganoderma</i> sp.)						
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4351	632	601/618 (97%)	X	X	X
( <i>G.lucidum</i> )						
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4361	638	609/626 (97%)	X	X	X
( <i>G.lucidum</i> )						
<i>Ganoderma applanatum</i>	cbs 175-30	610	609/610 (99%)	X	X	X
( <i>G.sp</i> )						
<i>Perenniporia medullo-panis</i>	4597-1	632	414/447 (92%)	X	X	
( <i>P.subacida</i> )						
<i>Perenniporia medullo-panis</i>	4597-2	636	414/444 (93%)	X	X	
( <i>P.subacida</i> )						
<i>Phellinus pini</i>	202	653	627/636 (98%)	X	X	X
( <i>P.tuberculosis</i> )						
<i>Phellinus torulosus</i>	223	560	176/177 (99%)	X		
( <i>P.weirii</i> )						
<i>Spongipellis spumeus</i>	314	615	163/166 (98%)	X		
( <i>S. delectans</i> )						

Les résultats des BLAST présentés dans le Tableau II.6 ont donné pour chacune de nos souches bien identifiées au départ selon les critères anatomo-morphologiques un genre et une espèce différents. Ainsi, les BLAST des séquences des genres *Spongipellis*, agents de pourriture fibreuse révèlent des séquences des genres *Phlebia*, champignons de pourriture cubique. Nous avons les mêmes cas de figure pour les BLAST des genres *Climacocystis*, *Ganoderma* et *Meripilus*, agents de pourriture fibreuse, qui affichent successivement les genres *Antrodia* et *Phlebia*, agents de pourriture cubique. Nous notons que la séquence proche de *Lenzites betulina* révélée après le BLAST est une souche morphologiquement très éloignée de celle-ci : *Heterobasidion annosum*; en effet, le genre *Lenzites* possède un hyménium tubulé alors que l’hyménium du genre *Heterobasidion* est granuleux. Enfin, le BLAST du genre *Trametes* révèle une Agaricale : *Rickenella*.

Tableau II.6 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné un genre différent. Dans ce tableau figurent le nom de la souche étudiée, son numéro de référence, le nombre de paires de bases de la séquence amplifiée (npb), la longueur de la séquence utilisée pour la comparaison par BLAST avec son pourcentage d’identité noté entre parenthèse, le genre et l’espèce de la séquence la plus proche notés entre parenthèses.

Nom de la souche	N° Référence labo	npb	Identité BLAST Longueur séquence et %
<i>Cerrena unicolor</i> ( <i>Spongipellis delectans</i> )	3948-1	615	256/280 (91%)
<i>Cerrena unicolor</i> ( <i>Spongipellis delectans</i> )	3948-2	605	300/341 (87%)
<i>Climacocystis borealis</i> ( <i>Antrodia vaillantii</i> )	526	616	600/602 (99%)
<i>Ganoderma lucidum</i> ( <i>Antrodia vaillantii</i> )	4301	573	167/178 (93%)
<i>Lenzites betulina</i> ( <i>Heterobasidion annosum</i> )	102-11-1	591	575/587 (97%)
<i>Meripilus giganteus</i> ( <i>Phlebia</i> sp.)	4357	649	173/174 (99%)
<i>Oxyporus latemarginatus</i> ( <i>Antrodiella semisupina</i> )	4370	620	602/610 (98%)
<i>Spongipellis spumeus</i> ( <i>Phlebia brevispora</i> )	986	626	177/177 (100%)
<i>Spongipellis spumeus</i> ( <i>Phlebia brevispora</i> )	988	626	177/177 (100%)
<i>Trametes odorata</i> ( <i>Rickenella pseudogrisella</i> )	534	555	167/171 (98%)
<i>Trametes odorata</i> ( <i>Rickenella pseudogrisella</i> )	166	565	167/170 (98%)

## II.4. Discussion

### II.4.1. Analyse du polymorphisme de restriction (RFLP) des ITS et de la taille des ITS

La longueur des fragments amplifiés varie de 550 à 895 paires de bases. Des résultats similaires ont été obtenus avec de nombreuses autres espèces fongiques (Henrion *et al.*, 1992 ; Gardes et Bruns, 1993). Les différences de longueur d'ITS entre souches peuvent être utilisées comme un premier élément de caractérisation sans toutefois pouvoir donner d'indication sur le type de pourriture. Par ailleurs, cette évaluation du nombre de paires de bases des ITS pour les différentes souches montrent les situations suivantes : 47% des ITS étudiés ont une longueur comprise entre 600 et 650 pb, 16 % entre 650 et 675 pb et 17 % entre 725 à 750 pb. Les 20 % de souches restantes se répartissent assez régulièrement entre 550 et 895 pb (en dehors des classes précitées) pour la longueur de leur ITS.

Au vu de ces résultats, nous suggérons que le polymorphisme détecté soit dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de restriction). En effet, la technique PCR/RFLP repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotide de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction.

Nous pensons qu'un mécanisme d'évolution probablement basé sur des crossing-over inégaux, homogénise régulièrement les copies de l'ADN ribosomal et s'oppose à leur divergence par accumulation de mutations (Srivasta et Schlessinger, 1991).

Nous notons que la lecture des poids moléculaires des amplifiats sur gel d'agarose présente une imprécision de l'ordre de 12%. La charge d'une molécule d'ADN est proportionnelle à sa longueur et les forces de frottements qui agissent sur elle lors de la migration sont liées à sa longueur. Par conséquent, plus une molécule est longue, plus elle migre lentement. En théorie donc, l'électrophorèse sur gel permet de séparer un mélange de molécules d'ADN en fonction de leurs tailles. La dimension des pores du gel et leur homogénéité sont des paramètres déterminants du pouvoir de résolution d'un gel qui, au mieux ne peut être que de quelques dizaine de paires de bases (Avarre, communication personnelle). Dans ce travail, toutes les électrophorèses ont été réalisées dans des conditions similaires, ont migré avec le même voltage et avec le même appareillage.

Nous notons que, pour 10 souches, il s'avère impossible d'obtenir un amplifiat. En supposant que chaque souche a ses particularités car le champignon varie tant au niveau de la qualité de l'ADN obtenu que de la quantité d'ADN. Nous supposons que les pigments restants après extraction de l'ADN inhiberaient la Taq polymérase en bloquant la phase d'élongation. Une situation similaire a été rencontrée avec le genre *Pisolithus* (Ducousso, communication personnelle). L'ajout de fortes doses, jusqu'à 1mg/ml de Bovine Serum Albumine dans les

réactifs de PCR permet de contenir ces effets inhibiteurs (Avarre, communication personnelle). Il serait envisageable de réaliser ces réactions de PCR en éliminant les pigments restant après le protocole classique d'extraction de l'ADN et en ajoutant, au besoin 1mg/ml de Bovine Serum Albumine.

La somme des nombres de paires de bases des fragments de chaque profil de restriction permet d'identifier trois situations qui peuvent être interprétées de la façon suivante. Le premier cas s'ajuste parfaitement à la théorie : la somme des nombres de paires de bases des fragments de chaque profil de restriction correspond au poids moléculaire de l'ITS. Dans le deuxième cas, on peut suggérer que l'enzyme de restriction utilisée génère de petits fragments susceptibles d'être "perdus" dans le gel au cours de la migration ou que l'enzyme utilisée génère deux fragments ou plus de poids moléculaires exactement identiques. Les interprétations possibles du troisième cas sont plus complexes et nous évoquerons deux hypothèses. Première hypothèse : les souches étudiées sont en fait des mélanges de plusieurs individus ayant un ITS avec le même nombre de paires de bases. Deuxième hypothèse : les souches étudiées sont dicaryotiques et hétérozygotes au moins pour cette portion d'ADN ribosomique. Cette deuxième hypothèse peut expliquer au plus un doublement du nombre de paires de bases par rapport au nombre de paires de bases du fragment initial non digéré. Dans certains cas, nous observons des sommes comprises entre 2 et 3 fois le nombre de paires de bases du fragment non digéré. Dans ces cas, nous pouvons suggérer que différentes familles (de 2 à 3 au moins) de gènes ribosomiques sont capables de co-exister au sein d'un même thalle. Cette situation avait déjà été suspectée pour un autre groupe de champignons : les lactaires à lait rouge (Guerin-Laguet, 1998).

La PCR/RFLP permet, en un temps court, de mettre en évidence la variabilité d'une séquence nucléotidique. Toutefois, cette méthode exige la constitution d'une banque de données personnelles importante et difficilement échangeable des faits d'une sensibilité importante de la réaction de PCR (concentration d'ADN, conditions d'amplification) et d'une imprécision de lecture de la taille des bandes ; cela obère largement les possibilités de développement de cette méthode dans les analyses de diversité au sein de populations nouvelles. La PCR/RFLP semble donc être un outil à restreindre par exemple à des travaux sur le suivi au laboratoire ou *in situ* de souches déjà connues et répertoriées en banques de données.



#### II.4.2 Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données (BLAST)

Nous notons que la plupart des différences sont situées dans les portions ITS1 et ITS2 non codant. La partie codant pour la petite sous unité 5,8S restent beaucoup moins variable, voire totalement conservée entre espèces proches. L'hyper variabilité des espaceurs non codant et la plus grande stabilité des parties codant ont déjà été signalées par Berbee et Taylor (1993) et Hibbett (1996).

L'utilisation de la partie 5,8S est souvent suffisante pour retrouver en banque de données des séquences proches voire identiques et appartenant au même genre fongique. L'ajout de la partie ITS1 à l'analyse par BLASTn permet de retrouver en banque de données des séquences proches appartenant à la même espèce fongique, sous réserve que des séquences de cette espèce aient été déposées. La partie ITS2, quand elle est ajoutée au 5,8S, n'apporte pas le même niveau de précision taxonomique. Des résultats similaires ont été observées entre les espèces partiellement intercompatibles du genre *Perenniporia* par Boidin et Lanquetin (1997). Nous constatons que nos séquences du genre *Spongipellis*, agents de pourriture fibreuse sont proches de séquences du genre *Phlebia*, champignons de pourriture cubique. Nous avons les mêmes cas de figure pour les BLAST de nos séquences des genres *Climacocystis*, *Ganoderma* et *Meripilus*, agents de pourriture fibreuse, qui sont proches des genres *Antrodia* et *Phlebia*, agents de pourriture cubique. Boidin *et al.*, (1998) ont obtenu des résultats similaires avec le genre *Gloeophyllum*, agents de pourriture cubique proche du genre *Trametes*, agent de pourriture fibreuse. Il semble donc bien que l'évolution des ITS soit indépendante de caractères fonctionnels comme la capacité à dégrader le bois en pourriture cubique ou en pourriture fibreuse. Nous avons aussi observé que nos séquences du genre *Trametes* sont proches d'une Agaricale : *Rickenella*. Inversement, Thorn *et al.* (2000) ont constaté qu'un *Pleurotus* sp., à une séquence d'ITS proche d'Aphyllophorales. Ces homologues importantes entre espèces taxonomiquement éloignées peuvent être dues à l'hypervariabilité des ITS qui, évoluant sans contrainte particulière, peuvent au gré de mutations aléatoires, temporairement converger.

Parmi les facteurs de spéciation, les transferts horizontaux peuvent avoir un impact important. En effet, ceux-ci confèrent un avantage considérable en provoquant des changements plus importants que les mutations et permettent une adaptation à un environnement variable ou à la colonisation de nouveaux milieux. C'est un facteur de spéciation et d'évolution moléculaire (Woese, 2000). Ainsi, nous pouvons admettre que les fonctions enzymatiques impliquées dans la dégradation des fibres lignocellulosiques puissent évoluer en pourriture cubique ou en pourriture fibreuse ou les deux à la fois expliquant, au moins en partie l'apparente incongruence entre les séquences ITS et certaines caractéristiques enzymatiques des souches.



Koski et Golding (2001) ont montré que les résultats de BLASTn n'étaient pas suffisants pour démontrer la survenue de tels événements et qu'il convenait d'inclure aux méthodes de phylogénie des outils statistiques permettant de confirmer ces événements de transferts. À l'inverse, la présence de gaps peut également constituer la preuve d'un lien de parenté entre individus. Toutefois, l'existence de gaps très grands peut avoir pour origine des problèmes techniques au niveau du séquençage (Risler *et al.*, 2003).

Les résultats de BLASTn menés avec nos séquences dans la banque de données de NCBI nous permettent d'envisager l'utilisation de cet outil pour l'identification à minima du genre d'une souche pour laquelle nous ne disposons pas d'information quant aux caractéristiques morpho-anatomiques des sporophores, mais pour laquelle nous savons que de nombreuses séquences du genre sont disponibles. Afin de préciser cette caractérisation taxinomique moléculaire, il paraît souhaitable de compléter les données de séquences d'ITS par exemple d'autres séquences ribosomales nucléaires ou mitochondriales ou en s'appuyant sur d'autres gènes, comme celui codant pour la  $\beta$ tubuline. L'utilisation combinée d'autres gènes structuraux en plus des ITS augmenterait la précision taxinomique de ces méthodes.

Nous avons constaté que 17 % de nos séquences provenaient d'Ascomycètes. Actuellement, nous n'avons pas d'explication sur l'origine et le maintien de ces co-cultures au fil des repiquages. Cette diversité taxinomique de contaminants, étroitement associée au mycélium fongique, de manière extracellulaire voire intracellulaire reste à explorer (Avarre, communication personnelle). Dans certains cas, nous avons pu constater qu'une modification de la composition du milieu de culture, notamment de la source de carbone en remplaçant par exemple le glucose par de la cellulose modifie l'équilibre entre les partenaires de la co-culture et permet l'émergence de l'Ascomycète.

## **II.5. Conclusion**

Afin de caractériser les souches de la collection du Cirad, nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences partielles d'ADN ribosomique indépendamment au recours aux caractères morphologiques macro- et microscopiques des sporophores nécessaires à l'identification des genres et espèces.

L'adaptation du kit Qiagen pour végétaux supérieur permet d'extraire l'ADN des champignons à partir de quelques mg de mycélium ; extraits d'ADN qui nous ont permis d'obtenir, avec la plupart des souches étudiées, un amplifiat d'ITS d'une taille variant de 550 à 895 paires de bases. Nous avons aussi mis en évidence une importante marge d'erreur, de l'ordre de 12 %, dans la lecture sur gel des poids moléculaires des molécules d'ADN nous conduisant à préférer le séquençage direct pour la détermination précise de la longueur des

amplifiats. La PCR-RFLP a démontré une bonne capacité à caractériser une souche donnée grâce à l'obtention de profils différents obtenus par l'utilisation de plusieurs enzymes de restrictions. Ainsi, nous avons démontré que l'étude de la diversité de l'ITS par PCR-RFLP constitue un moyen de discrimination permettant de différencier les souches les unes des autres. Cependant, cette méthode requière la constitution d'une base de données dont l'utilisation reste soumise à une part d'interprétation qui ne permet pas de travailler sur un matériel inconnu de la banque de données. Cette technique simple rapide est efficace et parfaitement adaptée au suivi de souches connues dans des essais contrôlés.

L'analyse par BLASTn des séquences obtenues avec 57 souches de la collection du Cirad nous a permis de placer les limites résolutive du fragment ITS1/ITS4 pour la caractérisation de ces souches. L'utilisation de ce fragment présente plusieurs avantages notamment la bonne reproductibilité d'obtention des séquences et l'existence d'une importante quantité de séquences en banque de données. La variabilité de ce fragment, en particulier pour les régions ITS1 et 5,8S, est souvent suffisante, mais toujours dépendante de la qualité des séquences de la banque, pour caractériser le niveau taxinomique du genre et de l'espèce de la souche. Sous réserve de vérification de la base des séquences utilisées pour le BLASTn, cette méthode donne des indications taxinomiques pour des souches ou des mycéliums pour lesquels aucune autre caractéristique n'est disponible. L'identification proprement dite pourra être faite ultérieurement en précisant les caractéristiques morpho-anatomiques des sporophores.

Cette étude taxinomique des souches de la collection du Cirad nous a permis de caractériser la diversité des champignons dégradant le bois, permettant d'initier les recherches présentées dans les Chapitres III et IV.

## **CHAPITRE III**

**ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES CHEZ LES  
CHAMPIGNONS DE POURRITURE CUBIQUE ET  
FIBREUSE.**

## CHAPITRE III : Etude des relations phylogénétiques chez les champignons de pourriture cubique et fibreuse.

### III.1. Introduction

La phylogénie peut être définie simplement comme l'histoire évolutive d'organismes ou de gènes. Les grandes étapes de l'Histoire évolutive des Basidiomycètes sont reprises dans le Tableau II.1. La phylogénie définit l'enchaînement des espèces animales, végétales ou fongiques au cours du temps. Cette définition introduit explicitement les relations de parenté entre les espèces. Il faut rappeler dans ce chapitre que les concepts et définitions de la notion d'espèces déjà longuement débattus continuent d'évoluer. Ces concepts d'espèces sont basés sur les données biologiques, des homologues phénotypiques, des paramètres écologiques, et parfois des données moléculaires, l'ensemble constituant la taxonomie polyphasique, c'est-à-dire s'appuyant sur un ensemble de caractères, tant phénotypiques que moléculaires et biologiques. De tels paramètres sont difficiles à étudier chez les champignons pour plusieurs raisons et notamment parce qu'il est encore très difficile de cultiver et maintenir des souches de Basidiomycètes (Hibbett *et al.*, 1997). Afin de définir le concept d'espèces chez les champignons, les chercheurs ont utilisé des expériences de comptabilité sexuelles entre les populations, reprenant directement le concept de Mayr (1975). La compatibilité sexuelle entre deux individus est déterminée par l'observation des premières étapes de croisement jusqu'à la formation de connexions mycéliennes (Brasier, 1992). Cependant, l'isolement reproductif n'est pas systématiquement en accord avec les descriptions d'autres caractères spécifiques (Harrington et McNew, 1998). Ainsi dans le genre *Lentinula* de la famille des Agaricaceae, des espèces asiatiques ont été classées par des caractères phénotypiques de compatibilité sexuelle, mais des études phylogénétiques montrent que ces espèces seraient, au point de vue évolutif, différentes et appartiendraient en fait à des taxons relativement éloignés.

Par ailleurs, des analyses phylogénétiques de séquences d'ADN de Basidiomycètes saprophytes et de Basidiomycètes ectomycorhiziens révèlent qu'ils sont proches, suggérant ainsi que la capacité des champignons à établir des symbioses ectomycorhiziennes aurait émergé à partir d'un ou plusieurs groupes de champignons saprophytes, et non parasites (Bruns *et al.*, 1991 ; Hibbett *et al.*, 1997). Des analyses phylogénétiques réalisées par Moncalvo *et al.* (2000) révèlent que les Agaricales ectomycorhiziennes seraient issues de Polyporales, champignons décomposeurs de bois. Parallèlement, Hibbett *et al.*, (2000) suggèrent par des études phylogénétiques que certains champignons saprophytes deviennent ectomycorhiziens, puis retrouvent leur état saprophyte et inversement. Dans notre étude, présentée au Chapitre II, nous avons présenté des résultats qui vont dans le même sens : l'ectomycorhizien *Tomentellopsis* est proche de *Gloeophyllum*, champignon saprophyte et des

Agaricales regroupant les genres *Lepista*, *Panellus*, *Tricholoma* et *Rickenella* se positionnent indistinctement d'Aphyllophorales. Cette capacité de passer d'un mode saprophytique à symbiotique et *vice-versa* impliquerait que ces espèces de champignons aient conservé des enzymes capables de dégrader la matière organique, ce qui a été confirmé chez certains Basidiomycètes ectomycorhiziens (Leake et Read, 1997).

Tableau III.1 : Grandes étapes de l'Histoire évolutive des Basidiomycètes.

	<i>Période</i>	<i>Temps</i>	<i>Principaux événements</i>	<i>Références</i>
Ère secondaire Mésozoïque	Crétacée	<145 MA	Plantes fossiles ressemblant aux Ericaceae	Nixon et Crepet (1993)
			Evolution des champignons supérieurs	Berbee et Taylor (1993)
	Trias	<245 MA	Evolution des lignées de Basidiomycètes supérieurs	
	Carbonifère	<363 MA	Basidiomycètes fossiles	Dennis (1970)
Ère primaire Paléozoïque	Dévonien	<409 MA	Divergence entre les Basidiomycètes et les Ascomycètes	Berbee et Taylor (1993)
	Silurien	<439 MA	Ascomycètes fossiles	Sherwood-Pike et Gray (1985)
			Fossile de champignons ressemblant à <i>Glomus</i>	Redeker <i>et al.</i> (2000)
	Ordovicien	<510 MA	Première plante terrestre	Kenrick et Crane (1997)
			Pré-Basidiomycètes/Ascomycètes, et Gloméromycètes	Berbee et Taylor (1993)

Dans ce travail, les études phylogénétiques portant sur 57 Basidiomycètes dégradant le bois en pourriture cubique ou fibreuse et provenant de pays tropicaux et de pays tempérés ont été réalisées en amplifiant, en séquençant et en analysant une partie de l'opéron nucléaire ribosomique avec les amorces ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990).

L'ADN ribosomique nucléaire constitue un outil de typage précieux, à tous les niveaux systématiques. Comme nous l'avons défini dans le Chapitre II.2, les parties du génome engendrant les ARN ribosomiques sont suffisamment conservées au niveau spécifique pour être utilisées en phylogénie moléculaire : l'ARN 18S a beaucoup été utilisé dans la reconstitution de la phylogénie des champignons (Berbee et Taylor, 1993) et l'ARN 5,8S peut contribuer à l'identification taxonomique (Cullings et Vogler, 1998). Ces zones conservées délimitent l'espaceur intergénique non transcrit (IGS, *Inter Genic Spacer*), peu contraint évolutivement et donc souvent variable même à l'échelle intraspécifique (Henrion *et al.*,



1992). Par ailleurs, deux espaceurs intergéniques transcrits existent au sein du segment comportant les ARN ribosomiaux 18S, 5,8S et 25S (ITS, *Internal Transcribed Spacer*), dont ils sont excisés lors de la maturation : plus contraints, ceux-ci sont variables d'une espèce à l'autre mais plus rarement au sein d'une espèce (Bruns *et al.*, 1991).

Les différentes techniques de reconstruction phylogénétique font l'objet d'une littérature abondante (Felsenstein, 1995 ; Swofford *et al.*, 2001). Plusieurs types de caractères peuvent être utilisés pour proposer une hypothèse sur les relations de parenté dans un groupe d'espèces : données morphologiques, biochimiques (séquences d'acides aminés, allèles enzymatiques, etc.), écologiques et comportementales. Les caractères les plus utilisés chez les champignons sont les attributs morphologiques et anatomiques des espèces ainsi que plus récemment les séquences d'ADN de certaines parties du génome.

Ces principales méthodes sont les suivantes :

- *Les méthodes de distance (phénétique)* sont basées sur un calcul de la distance globale réalisé pour chaque paire d'espèces. Les distances calculées à partir de données moléculaires peuvent faire intervenir des modèles d'évolution moléculaire tenant compte de différences *a priori* dans les fréquences de base et les taux de substitution des bases ; ce sont les mêmes modèles que dans les méthodes de maximum de vraisemblance présentées ci-après. La matrice de distance obtenue va servir à élaborer un arbre binaire au moyen de divers algorithmes. Les plus connus sont la méthode "neighbour joining" (NJ) (Saitou et Nei, 1987) et le groupement selon l'association moyenne (UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages). L'UPGMA produit des arbres ultramétriques supposant l'existence d'une horloge moléculaire (taux d'évolution constant), contrairement au NJ qui produit des arbres additifs.
- *Les méthodes de parcimonie* sont basées sur les caractères et non sur les distances globales entre paires d'espèces. Dans le cas de séquences d'ADN, les caractères sont les positions des bases alignées et leurs états sont les différentes bases (A, C, G et T). Les méthodes de parcimonie visent à reconstruire l'arbre postulant le moins de changements évolutifs possibles, ce qui revient à minimiser le nombre des homoplasies, donc à maximiser celui des homologues. Il est possible de pondérer différemment chaque type de substitution, par exemple de A vers G ou de T vers C : c'est la parcimonie généralisée. De la même façon, les sites peuvent se voir attribuer des pondérations différentes. Le problème est d'estimer les pondérations des substitutions ou des caractères.

- Les méthodes de maximum de vraisemblance (ML, pour *Maximum Likelihood*) concernent également les caractères individuels. Elles sont basées sur un modèle d'évolution moléculaire prenant en compte les fréquences des bases, les taux de substitution et éventuellement l'hétérogénéité de ces taux entre les sites. Il existe plusieurs modèles plus ou moins complexes en fonction du nombre de paramètres inférés. Les méthodes de maximum de vraisemblance cherchent la topologie de l'arbre la plus probable (*vraisemblable*) en fonction du modèle et des données (les séquences).

Une méthode généralement utilisée pour l'évaluation de la robustesse des nœuds présents dans un arbre est le bootstrap. Cette méthode part du postulat que les caractères évoluent de manière indépendante. Elle a été introduite en phylogénie par Felsenstein en 1995 dans l'ensemble de logiciels PHYLIP (Felsenstein, 1995). Le bootstrap consiste à simuler à partir de l'alignement de départ, un nombre important d'alignements (au moins 500) de même taille par tirage aléatoire avec remise au sein des sites. A partir de chacun de ces alignements simulés, un arbre est reconstruit et l'on peut reporter sur chaque branche interne de l'arbre de départ, le nombre de fois où cette branche a été retrouvée dans les données simulées. On considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap  $> 95 \%$  sont fiables ; cette valeur ou indice de bootstrap sert à évaluer la confiance qu'on peut avoir dans cette branche. Pour accorder une signification statistique acceptable à cette méthode on réalise, en général 1000 répétitions de bootstrap.

La reconstruction phylogénétique produit un arbre phylogénétique et se base sur les caractères observés chez deux ou plusieurs espèces qui pourraient indiquer une proche parenté : les caractères homologues (hérités d'un ancêtre commun). La reconstruction phylogénétique utilise les synapomorphies, c'est-à-dire les caractères nouveaux acquis par une espèce ancestrale et transmis à sa descendance.

Lors de la reconstruction phylogénétique plusieurs jeux de données sont fréquemment utilisés (différents gènes nucléaires, gènes nucléaires et gènes cytoplasmiques, caractères moléculaires et caractères morphologiques...). Si les différents jeux de données produisent des arbres non congruents, cela contredit le modèle. C'est ce que l'on appelle « conflit phylogénétique » ou « incongruence phylogénétique » (Wendel et Doyle, 1998).

Ces conflits potentiels ne sont pas forcément inhérents aux techniques employées ou aux méthodes de reconstitution, mais peuvent résulter de processus biologiques variés tels que la recombinaison ou les duplications de gènes et de génomes, polyploïdie, (Wendel et Doyle, 1998) qui sont connues pour être des processus évolutifs majeurs chez les Eucaryotes notamment dans la diversification structurale et fonctionnelle des espèces (Ohno, 1970).

Les sources de conflits phylogénétiques sont multiples (Wendel et Doyle 1998). On peut les classer en trois groupes :

### *1°) Sources liées aux techniques utilisées*

Le problème peut venir du choix des gènes utilisés pour effectuer la reconstruction phylogénétique. En effet, pour avoir la meilleure phylogénie possible, il est recommandé d'utiliser des gènes dont les taux d'évolution reflètent le mieux possible la divergence entre les taxa étudiés. Ainsi, si les gènes employés ont des taux d'évolution faibles, on n'aura qu'une faible résolution phylogénétique ce qui pourra générer de l'incongruence. À l'opposé, des gènes évoluant très vite génèreront aussi de l'incongruence : le signal phylogénétique peut être ainsi brouillé par l'homoplasie. La longueur du gène influe aussi : il faut que suffisamment de nucléotides soient échantillonnés pour donner suffisamment de signal phylogénétique (Hillis, 1996).

Une autre source d'incongruence liée aux techniques employées provient de l'échantillonnage des taxa. On sait depuis longtemps (Felsenstein, 1995) que si celui-ci n'est pas assez dense, cela peut favoriser l'attraction de longues branches en analyse suivant le critère de parcimonie : deux espèces évoluant plus vite que les autres pour le locus considéré seront rapprochées lors de la construction de la phylogénie, même si elle ne sont pas particulièrement proches.

Outre les causes techniques d'incongruence, il existe des causes biologiques, plus intéressantes car elles nous renseignent sur l'histoire évolutive des espèces et des gènes en attirant notre attention sur certains problèmes clefs.

### *2°) Sources liées aux processus affectant les organismes*

Une première cause d'incongruence réside dans la convergence évolutive et dans l'évolution morphologique rapide. Certes ces deux phénomènes sont un peu différents mais ils agissent de façon similaire. La convergence évolutive crée des caractères similaires chez des taxa pouvant être très éloignés. Ainsi on peut citer l'aile des oiseaux et l'aile des chauves-souris ou encore le bec des canards et le bec de l'ornithorynque... Ces taxa seront regroupés alors qu'ils sont évolutivement éloignés. L'évolution morphologique rapide pose le problème contraire : deux taxa proches seront alors séparés lors de l'analyse.

Une autre cause d'incongruence est la radiation évolutive. C'est une diversification rapide d'organismes, plus rapide que la diversification génétique. Ainsi, lors de la reconstruction phylogénétique, les entre-nœuds seront courts et difficiles à résoudre en toute confiance.

Une troisième source d'incongruence est le transfert horizontal. C'est un processus permettant le transfert de matériel génétique de façon asexuée ou sexuée entre deux organismes. Ce transfert peut se faire par simple captation d'ADN extracellulaire chez les organismes

unicellulaires ou *via* des vecteurs comme virus et bactéries chez les unicellulaires et les pluricellulaires. Ce transfert peut s'effectuer entre des espèces très éloignées phylogénétiquement. Si le matériel transféré est pris en compte lors d'une analyse, il faussera la phylogénie en rapprochant ces espèces (Clark *et al.*, 1994).

Enfin, la dernière source de conflit liée à l'histoire des organismes est le polymorphisme trans-spécifique. Les organismes possèdent deux allèles ou plus, différents de chaque gène. L'origine des différents allèles est souvent lointaine et leur histoire est complexe. Dans certains cas, l'origine de deux allèles peut être antérieure à la formation de l'espèce considérée. Ainsi ces allèles pourront être partagés entre cette espèce et des espèces plus ou moins éloignées. Ainsi un allèle ancien a des chances de se retrouver chez des espèces pouvant être très éloignées (Cronn *et al.*, 1996). Ces espèces seront donc rapprochées par l'analyse phylogénétique si cet allèle est utilisé lors de la reconstruction.

### 3°) Sources liées aux processus affectant les gènes ou les génomes

Certains processus affectant directement les gènes peuvent générer des conflits phylogénétiques. Une source de conflit fréquente est la présence de duplications de gènes non soupçonnées. Une duplication va créer deux gènes qui vont évoluer. Afin de réaliser une phylogénie d'organismes, il faut employer des jeux de données ne contenant que des gènes orthologues c'est-à-dire des gènes homologues divergeant par spéciation. Si on inclut un ou plusieurs gènes paralogues, c'est-à-dire homologues divergeant par duplication, l'arbre obtenu retraçant les divergences entre les organismes sera biaisé par l'histoire de la duplication.

Les incongruences peuvent aussi être la conséquence de biais dans la composition en bases. En effet, dans la plupart des séquences ADN les quatre types de nucléotides A,T,G et C ne sont pas retrouvés avec la même fréquence. Ces biais en composition en bases vont influencer les mutations pouvant survenir (transitions, transversions). L'association de ces deux phénomènes peut provoquer des erreurs lors de la reconstruction qui peuvent être sources d'incongruence (Lockhart *et al.*, 1994).

Dans ce chapitre nous allons explorer les congruences et les incongruences entre la taxonomie établie sur des bases morpho-anatomiques et les relations phylogénétiques basées sur des comparaisons de séquences des ITS de 57 Basidiomycètes de la collection de souche du Cirad et de 96 séquences de référence. Deux méthodes d'analyse phylogénétiques sont utilisées : la méthode cladistique de parcimonie et la méthode de distance de neighbour-joining. Dans ce travail, une première étude phylogénétique est réalisée seulement pour la séquence ribosomique nucléaire 5,8S de l'ensemble des champignons étudiés et la seconde étude est effectuée en utilisant l'ITS complet : ITS1, 5,8S, ITS2.



## III.2. Matériel et méthodes

### III.2.1. Matériel biologique

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec les séquences de 57 Basidiomycètes de la collection de souches de champignons du Cirad et 96 séquences de référence extraites de NCBI après avoir effectué les BLASTn (Cf. Chapitre II). La liste des souches séquencées pour cette étude et les séquences de référence utilisées sont présentées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2 : Liste des 57 souches séquencées avec leur numéro de référence et les séquences de référence utilisées avec leur numéro d'accèsion dans NCBI.

Espèce	Séquences laboratoire		Séquences de référence
	Nbre de séquences	Numéro de référence	N° d'accèsion NCBI
<b>Antrodia serialis</b>	1	153	
<i>Antrodia carbonica</i>	1		AF287844
<i>Antrodia serialis</i>	1		AJ345010
<i>Antrodia sinuosa</i>	1		AJ345011
<i>Antrodia xantha</i>	1		AJ415569
<i>Antrodiella onychoides</i>	1		AJ006674
<i>Antrodiella semisupina</i>	1		AF126883
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>	1		AJ006684
<i>Cerrena unicolor</i>	1	3948-2	
<i>Climacocystis borealis</i>	1	526	
<i>Coniophora puteana</i>	1	CBS.132.70	
<i>Donkioporia expansa</i>	4	4415 ; 3021	AJ249501; AJ249500
<i>Engyodontium album</i>	1		AB106650
<i>Exidia truncata</i>	1		AF291279
<i>Favolus alveolaris</i>	1		975
<i>Fibroporia vaillantii</i>	3	4491 ; 57 D	AJ249266
<i>Fomes fomentarius</i>	2	3470	AY354213
<i>Fomitopsis officinalis</i>	1	4343	
<i>Fomitopsis pinicola</i>	8	4311; 4295	AF347106 ; AF533966 ; AJ560638; AY089731
<i>Fomitopsis</i> sp .	2		AF509932; AF509233
<i>Fusarium</i> sp.	1		AY237110
<i>Ganoderma applanatum</i>	1		CBS 175.30
<i>Ganoderma lucidum</i>	1		X78776
<i>Ganoderma resinaceum</i>	4	4361 ; 4351 ; 4143	AF255094 ;
<i>Ganoderma</i> sp.	4	4356	AF455510; AY22054AY508882;
<i>Gibberella sacchari</i>	1		AF455450
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	3	155	AJ420947; AJ420948
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	1		AJ406545
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	8	CBS.900.73; 67D	AF423117;



Suite Tableau III.2

	2	2031	AF455496
<i>Heterobasidion annosum</i>			
<i>Hexagonia nitida</i>	1	CBS.212.53	
<i>Hypochnicium geogenium</i>	1		AF429426
<i>Inonotus radiatus</i>	1	486	
<i>Laccaria fraterna</i>	1		AY162175
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1		AF229196
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1	440	
<i>Lentinus tigrinus</i>	1		AF 516521
<i>Lenzites betulina</i>	2	CBS.102.11.1; CBS.102.11.2	
<i>Lepista sordida</i>	1		AF241523
<i>Meripilus giganteus</i>	1	4357	
<i>Oligoporus stipticus</i>	1	332	
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	3	4211; 279; 365	
<i>Oxyporus</i> sp	1	4370	
<i>Panellus serotinus</i>	1		AY265847
<i>Perenniporia brevispora</i>	3		AB084616; AB084614; AB089739
<i>Perenniporia fraxinea</i>	1	190	
<i>Perenniporia medulla-panis</i>	2	4597.1; 4597.2	
<i>Perenniporia subacida</i>	4	985; 549	AF218403; AY089739
<i>Phellinus ferruginosa</i>	1		AY189700
<i>Phellinus igniarius</i>	2		AF251437
<i>Phellinus pini</i>	3	202	AF250930 ; AF420589 ; AY089743; AY089744
<i>Phellinus pomaceus</i>	1	300	
<i>Phellinus torulosus</i>	1	223-1	
<i>Phellinus tuberculosus</i>	1		AF250929
<i>Phellinus weireii</i>	1		AF251438
<i>Phlebia brevispora</i>	3		AB084616; AB0846614; AB0846615
<i>Phlebia tremellosa</i>	1		AY354219
<i>Phlebiopsis roumeguerei</i>	1	6570	
<i>Pleurotus opuntiae</i>	1		AY450340
<i>Podoscypha petalodes</i>	1		LY4317
<i>Polyporus alcularius</i>	1		AF516524
<i>Polyporus alveolaris</i>	2	975	AB070828
<i>Polyporus brumalis</i>	2		AF516533; AF516531
<i>Porodaedalea pini</i>	2		AY436621; AY436622
<i>Postia placenta</i>	1		AY089735
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	2		AF363769; AF363772
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	2	27.0	AF363759; AF363770
<i>Rickenella pseudogrisella</i>	1		U66437
<i>Skeletocutis amorphia</i>	2		AJ006677; AY293214
<i>Spongipellis delectans</i>	1		AJ006670
<i>Spongipellis spumeus</i>	6	314 ; 986; 988 ; 4566	AJ006671
<i>Stereum rugosum</i>	1	3837	

<i>Stereum sanguinolentum</i>	1	CBS.529.50	
<i>Stereum</i> sp.	1		AY207328
<i>Tomentellopsis bresadoliana</i>	1		AJ410779
<i>Tomentellopsis submollis</i>	1		AJ438983
<i>Trametes hirsuta</i>	1		AY 494 980
<i>Trametes odorata</i>	2	166 ; 534	
<i>Trametes pubescens</i>	1	288	
<i>Trametes versicolor</i>	11	34671; CBS.737.85; 8A ; 3467	AF347107;AY204503; AY204545; AY309019; AY354226; AY504663; AY309018
<i>Tricholoma terreum</i>	1		AF377212
<i>Tyromyces chioneus</i>	1		AF335447

### III.2.2. Méthodes phylogénétiques

Les deux méthodes choisies pour les comparaisons de nos séquences sont les suivantes :

- La méthode basée sur les distances entre isolats. Les résultats sous forme de matrice carrée correspondent à toutes les comparaisons possibles par paire de taxa. Cette matrice traitée par le programme Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987) donne un arbre optimisant les longueurs des branches.
- La méthode de parcimonie qui examine tous les sites variables pour un ensemble de séquences alignées et construit un arbre (ou des arbres) où les séquences sont placées de telle manière que le nombre total de substitution, site par site, soit minimum dans l'ensemble de l'arbre. Le programme informatique utilisé est PAUP (Phylogenetic Analyses Using Parsimony ; Swofford, 2001). Cette méthode est appliquée surtout pour traiter des séquences assez proches (supérieur à 85% d'homologie).

Les séquences de référence sont intégrées dans les alignements et jouent alors le rôle de référence ou point de comparaison. Les arbres sont réalisés grâce au logiciel Njplot. La méthode employée pour vérifier la robustesse des nœuds est la méthode de bootstrap (Felsenstein, 1995) calculée à l'aide du groupe de programmes PHYLIP (*Phylogeny inference package* ; 1995).

### III.2.2.1. Phylogénie de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S de l'ensemble des champignons étudiés

Après avoir obtenu et corrigé les 57 séquences de nos souches à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel Sequence navigator, puis après les avoir assemblées avec le logiciel Autoassembleur (front et reverse), les alignements des séquences nucléotidiques ainsi que les reconstructions d'arbres sont réalisés sous les logiciels CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1994) et sous Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987). L'arbre produit a ensuite été mis en forme avec le logiciel TreeView (Page, 1996). Afin de simplifier la lecture de l'arbre, nous l'avons scindé en deux parties (Figure III.3). Nous avons positionné la racine potentielle avec un groupe externe (ou «outgroup») de trois Ascomycètes : *Fusarium* sp., *Gibberella sacchari*, et *Engyodontium album*.

### III.2.2.2. Reconstruction des arbres phylogénétiques de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S en ajoutant les ITS1 et ITS2 pour les genres : *Spongipellis*, *Gloeophyllum* et *Trametes*.

Les résultats obtenus après la reconstruction de l'arbre phylogénétique 5,8S, nous a conduit à sélectionner des séquences afin d'affiner l'analyse phylogénétique en utilisant l'ITS complet : ITS1, 5,8S et ITS2. Ce tri a été fait selon deux types de résultats : 1) Les positions de nos souches étaient prévisibles, c'est-à-dire situées proches des souches de référence de NCBI : seul l'analyse du genre *Gloeophyllum* sera réalisée car nous voulons vérifier que des souches de pourriture fibreuse se positionnent bien parmi des souches de pourriture cubique, 2) Les positions de nos souches sont éloignées et parfois même très inattendues ; en effet certaines espèces qui ne posent aucun problème d'identification selon les critères classiques morpho-anatomiques se situent proches d'espèces qui ne présentent pas de ressemblance.

Dans cette étude nous allons trier les souches des genres *Gloeophyllum*, *Tametes* et *Spongipellis* et donc obtenir trois arbres phylogénétiques. Pour ces reconstructions d'arbres phylogénétiques, nous allons effectuer des BLAST pour chacune de nos séquences et les séquences de référence les plus proches vont être extraites de NCBI et être alignées avec nos séquences.

Ces trois arbres phylogénétiques sans racine ont été générés avec ClustalX par la méthode de Neighbour-Joining. Les arbres produits ont été soumis à une analyse de *bootstrap* avec  $n = 1000$ , aussi effectuée avec ClustalX. Les arbres produits ont été dessinés à l'aide du logiciel TreeView.

### III.3. Résultats

#### III.3.1. Analyse et alignement des séquences : Arbre 5,8S (Figure III.1).

La longueur des séquences analysées est comprise entre 215 et 251 paires bases donc légèrement plus que le 5,8S tout seul. Les séquences utilisées, centrées sur le 5,8S sont donc prolongées à chaque extrémité par une partie de l'ITS1 et l'ITS2.

A partir de l'arbre obtenu, nous mettons en évidence des clades distincts où les espèces se groupent selon les genres et selon la capacité à dégrader le bois en pourriture fibreuse ou cubique, tels que : *Gloeophyllum*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Fomitopsis*, *Pycnoporus*, *Oxyporus*, *Donkioporia*, et *Perenniporia*.

Nous notons également des clades non distincts qui regroupent des espèces de genres différents, notamment pour les genres *Podoscypha*, *Hexagonia*, *Skeletocutis*, *Spongipellis*, *Tyromyces*, *Lenzites*, *Climacocystis*, *Fomes*, *Cerrena* et *Polyporus*. Ainsi, nous observons que deux espèces de *Perenniporia medulla-panis* n° 4597-1 et 4597-2 se situent près de *Ganoderma*. De plus, les genres *Perenniporia* se situent parmi les *Polyporus*. Le clade des Agaricales regroupant les genres *Lepista*, *Panellus*, *Tricholoma* et *Rickenella* est bien isolé et se positionne parmi les Aphyllophorales.

Se pose également les questions des positions de certaines espèces telles que :

- *Spongipellis spumeus* N°314 situé proche de *Skeletocutis amporpha* et *Tyromyces spumeus*,
- *Fomitopsis pinicola* AF533966, champignon de pourriture cubique situé parmi les genres *Trametes* et *Phellinus*, champignons de pourriture fibreuse,
- *Phellinus igniarius* AF251437 situé parmi le clade *Trametes*,
- *Antrodia* AF345011 et AF423113 champignons de pourriture cubique situés dans le groupe des *Pycnoporus*, champignons de pourriture fibreuse,
- *Climacocystis borealis* N°526, champignon de pourriture fibreuse situé parmi *Fibroporia* et *Postia*, champignons de pourriture cubique.

#### III.3.2. Analyse et alignement des séquences pour les genres *Spongipellis*, *Gloeophyllum* et *Trametes*

Ces analyses sont présentées Figures III.2, III.3 et III.4 sous forme d'arbres phylogénétiques incluant respectivement les souches des genres *Spongipellis*, *Gloeophyllum* et *Trametes* positionnées par rapport à une sélection de souches de référence proches.

### **Position phylogénétique des souches du genre *Spongipellis* (Figure III.2)**

Les relations de parentés entre nos souches du genre *Spongipellis* et les souches de référence les plus proches extraites de NCBI sont présentées Figure III.2. L'arbre phylogénétique obtenu présente trois clades principaux nommés I, II et III. Les valeurs de *bootstrap* des branches soutenant les groupes I et II sont faibles : 49% et 57%.

Dans le groupe I *Spongipellis*, agent de pourriture fibreuse est proche de *Phlebia*, champignon de pourriture cubique.

Dans le groupe II.1, la position de notre souche *Spongipellis spumeus* n° 314 est bien en marge des autres souches de *Spongipellis* réparties dans les groupes I et III.

Le groupe II-2 présente deux configurations similaires pour les genres *Trametes*, *Pycnoporus* et *Perenniporia* et nous remarquons deux constitutions où *Perenniporia* est voisin de *Pycnoporus*. Par ailleurs *Ganoderma* et *Trametes* présentent une proximité dans les groupes II-1 et II-2.

Le groupe III est soutenu par une valeur de *bootstrap* de 100% et notre souche *Spongipellis spumeus* n° 4566 se trouve très proche de la souche de référence *Spongipellis* AJ006671.

Enfin, *Pleurotus* qui est une Agaricale se positionne parmi des Aphyllophorales proche des *Spongipellis*.

### **Position phylogénétique des souches du genre *Gloeophyllum* (Figure III.3)**

Dans cet arbre sont présentées les relations de parentés entre nos souches du genre *Gloeophyllum* responsables de pourriture cubique et les souches de référence les plus proches extraites de NCBI. L'arbre phylogénétique obtenu présente trois groupes principaux notés de I à III. Les valeurs de *bootstrap* des branches soutenant ces clades sont fortes : 75%, 91% et 100%. Les espèces *Gloeophyllum sepiarium*, *G. abietinum* et *G. trabeum* sont très homogènes. Cependant des questions se posent sur les positions des souches dans le groupe III parce que nous observons dans ce groupe un éclatement du genre *Gloeophyllum* pour les différentes espèces : *G. odoratum*, *G. sepiarium*, et *G. trabeum*, responsables de pourriture cubique qui voisinent avec des souches de pourriture fibreuse : *Trametes* et *Fomes*. Nous retrouvons une configuration similaire dans l'arbre des *Spongipellis*.

Nous observons la position de l'ectomycorhizien *Tomentellopsis* voisin de *Gloeophyllum*.



### **Position phylogénétique des souches du genre *Trametes* (Figure III.4)**

Dans cet arbre sont présentées les relations de parentés entre nos souches du genre *Trametes* responsables de pourriture fibreuse et les souches de référence les plus proches extraites de NCBI. Les valeurs de *bootstrap* des branches reliant les deux groupes principaux I et II sont faibles, 47% et 59%.

En général, nous retrouvons dans cet arbre une configuration similaire à celle obtenue dans l'arbre 5,8S où *Trametes* voisine avec le genre *Antrodia*. L'ectomycorhizien *Tomentellopsis* et les agaricales, *Lepista* et *Panellus*, se positionnent parmi les Aphyllophorales dégradant le bois, positions déjà constatées dans les arbres des espèces des genres *Spongipellis* et *Gloeophyllum*.

Enfin, les espèces *Trametes odorata* n°166 et n°534 se situent toutes deux parmi les souches de référence *Trametes versicolor* et les branches sont soutenues par des valeurs de *bootstrap* égales à 100%.

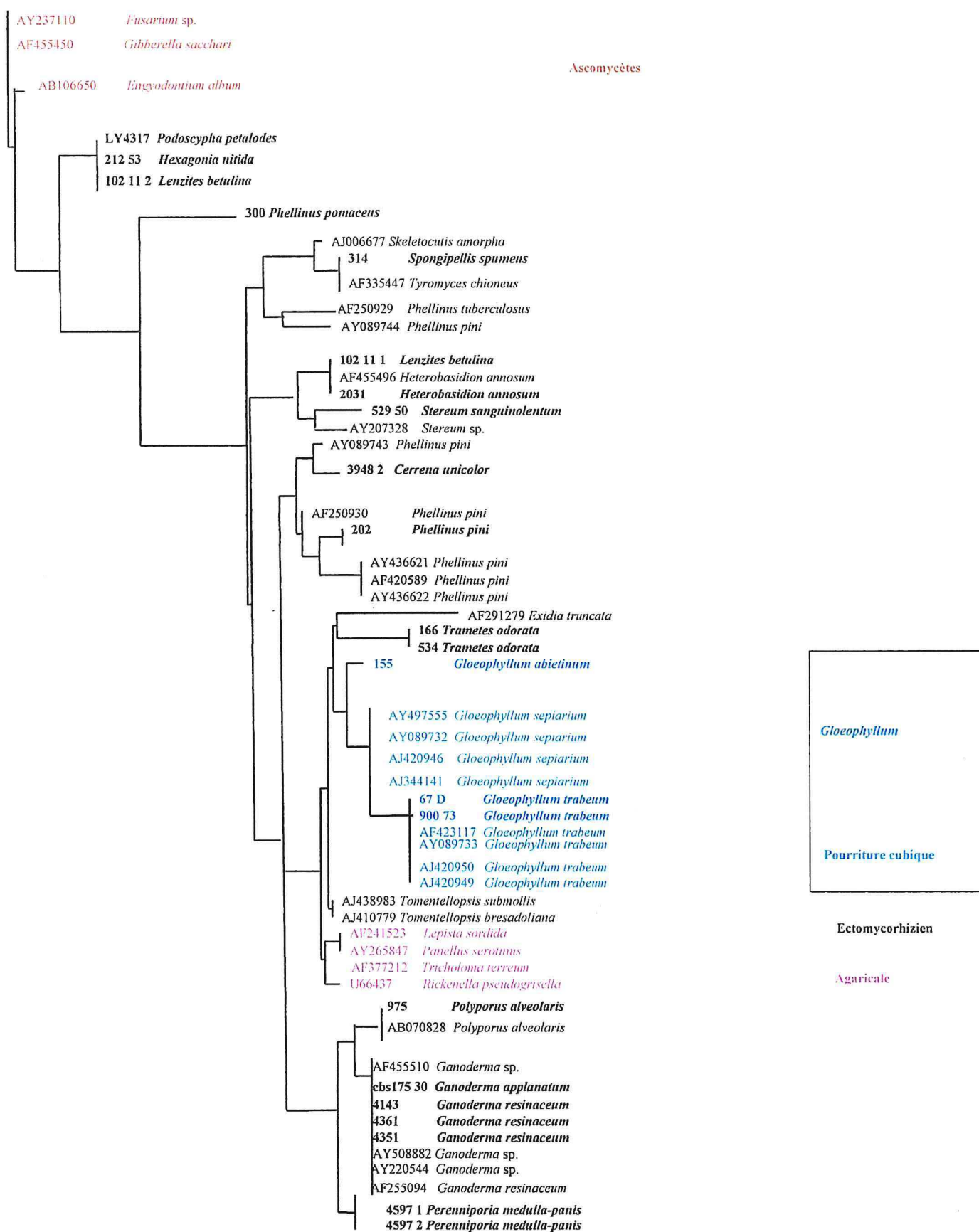


Figure III.1. Arbre phylogénétique de Basidiomycètes dégradant le bois, basé sur la comparaison des séquences ADNr de la région 5,8S obtenu par la méthode du Neighbor-Joining. Nos souches sont notées en gras. Les souches de pourriture cubique sont notées en bleu, les ectomycorhiziens figurent en vert et les Agaricales en violet. Sur la droite figurent les indications sur les clades où sont groupés les différents champignons. Les séquences de référence figurent avec leur numéro d'accension.

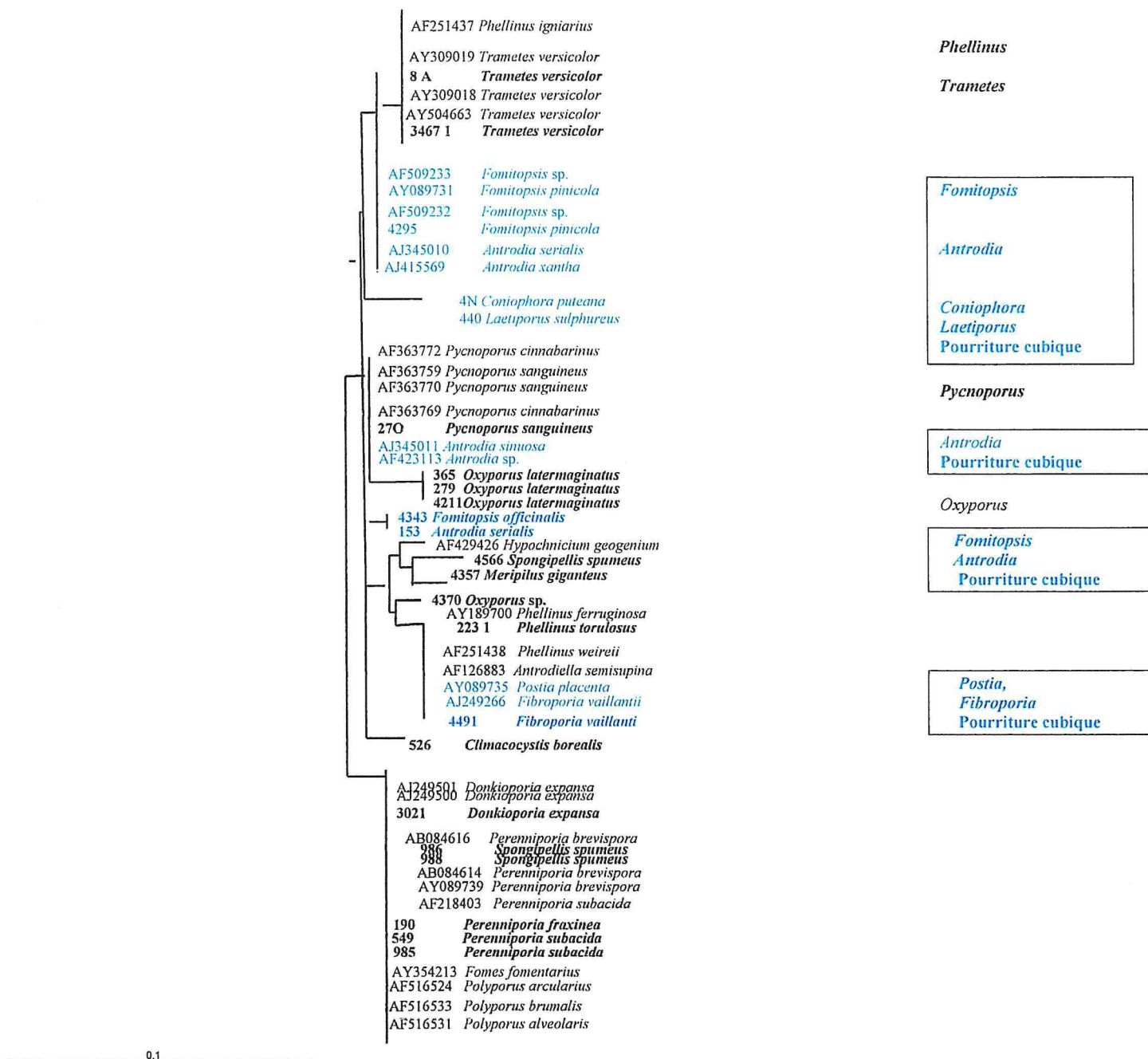


Figure III.1(Suite)

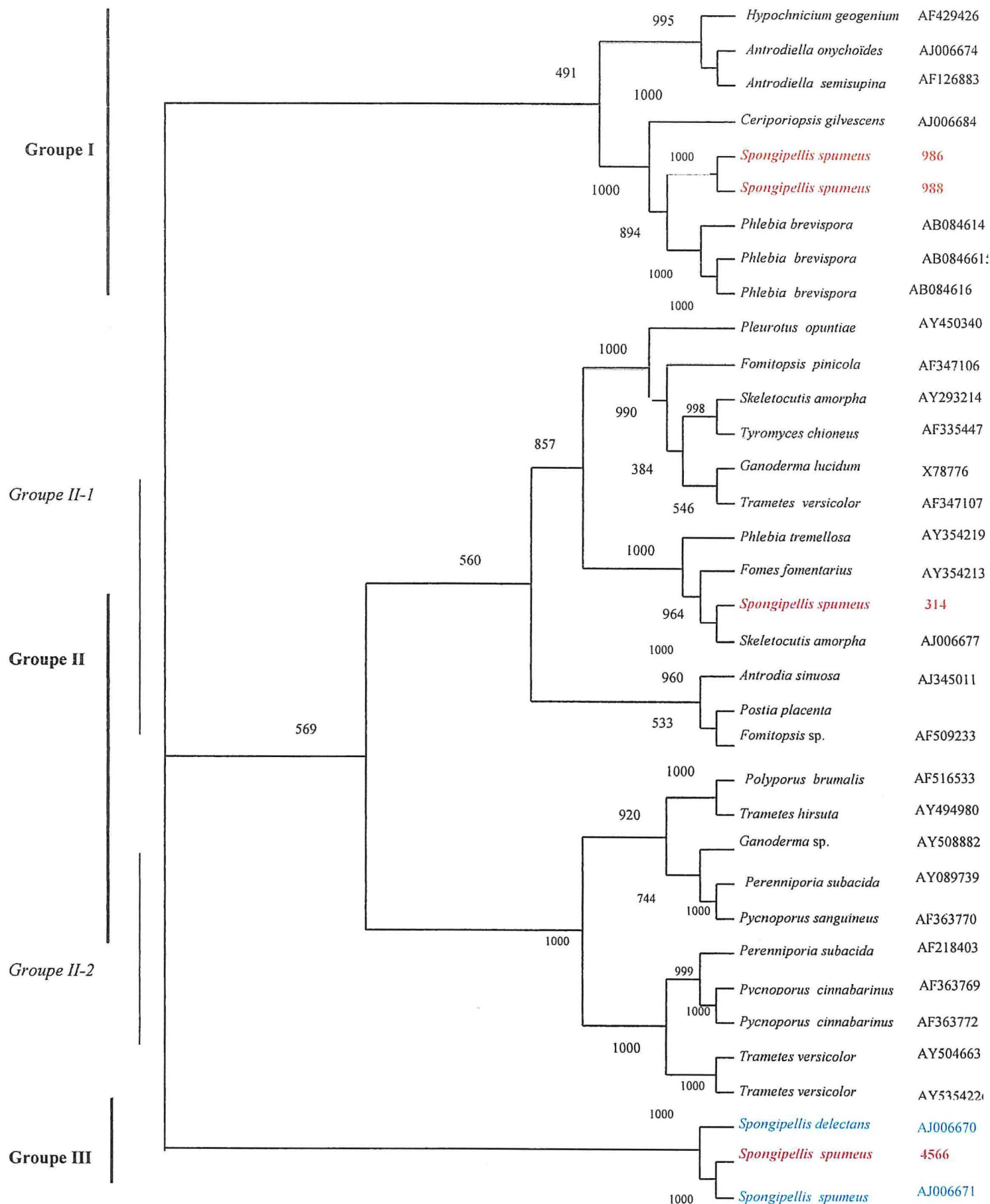


Figure III.2. Position phylogénétique d'espèces du genre *Spongipellis* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS1, 5,8S et ITS 2. L'arbre est construit par Neighbor Joining, avec un rééchantillonnage bootstrap de 1000 réplifications (les valeurs de bootstraps sont indiquées aux principaux nœuds de l'arbre). Nos souches sont notées en rouge et les séquences de référence *Spongipellis* sont notées en bleu.

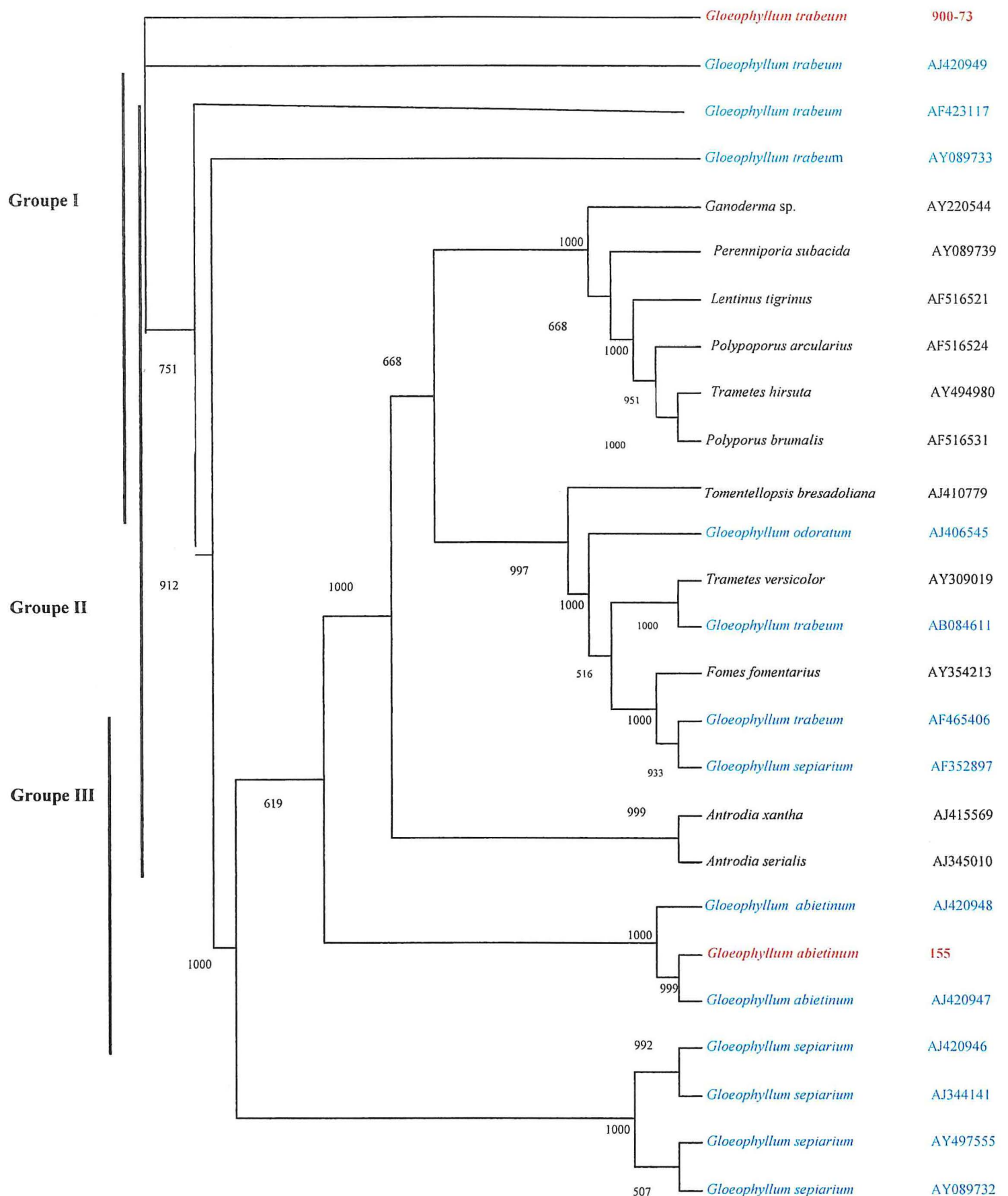


Figure III.3. Position phylogénétique d'espèces du genre *Gloeophyllum* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS1, 5,8S et ITS 2. L'arbre est construit par Neighbor Joining, avec un rééchantillonnage bootstrap de 1000 réplifications (les valeurs de bootstraps sont indiquées aux principaux nœuds de l'arbre). Nos souches sont notées en rouge et les séquences de référence *Gloeophyllum* sont notées en bleu.



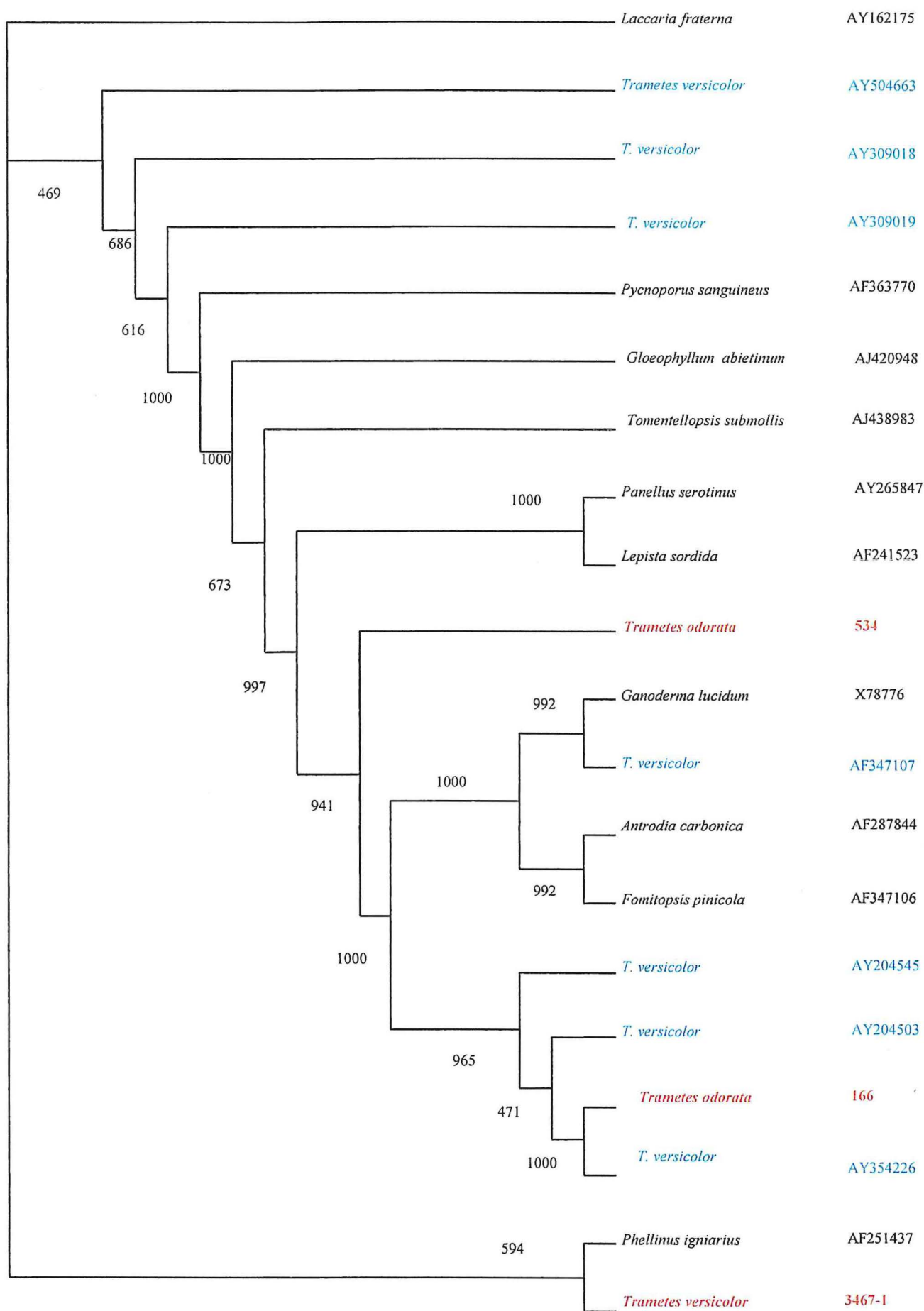


Figure III.4. Position phylogénétique d'espèces du genre *Trametes* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS1, 5,8S et ITS 2. L'arbre est construit par Neighbor Joining, avec un rééchantillonnage bootstrap de 1000 réplifications (les valeurs de bootstraps sont indiquées aux principaux nœuds de l'arbre). Nos souches sont notées en rouge et les séquences de référence *Trametes* sont notées en bleu.

### III.4. Discussion

Afin d'étudier les relations phylogénétiques interspécifiques des Basidiomycètes dégradant les bois, nous avons choisi de séquencer le fragment ITS1, 5,8S et ITS2 de variabilité adaptée à ce niveau taxonomique (Wu *et al.*, 1983 ; Moncalvo *et al.*, 2000). Les régions ITS sont utilisées pour étudier la phylogénie des champignons (Boidin *et al.*, 1998 ; Selosse et Durrieu, 2004) car elles présentent une grande variabilité jusqu'au niveau interspécifique mais restent bien conservées au niveau intra spécifique (Gardes *et al.*, 1991 ; Boidin *et al.*, 1998). De plus, nous avons choisi ce fragment car beaucoup de séquences sont disponibles en banque et nous pouvons intégrer nombre de séquences de références, afin de préciser les positions taxonomiques de nos souches.

Dans notre étude sur 103 Basidiomycètes nous avons obtenu 57 séquences nucléaires, les autres électrophorégrammes n'étant pas exploitables. Moncalvo *et al.* (2000) ont montré que chez les Basidiomycètes, l'ADN ribosomique de cette région nucléaire est caractérisé par la formation de structures secondaires qui peuvent inhiber la réaction d'amplification ; cela peut expliquer ces résultats. De plus les échantillons sont dicaryotiques et peuvent contenir des séquences ribosomiques différentes. Dans ce cas, les extraits d'ADN contiennent deux séquences ribosomiques différentes. Le signal de l'électrophorégramme pour ces fragments amplifiés et séquencés reste alors illisible. Une partie des résultats que nous avons obtenus avec ces souches en PCR-RFLP (Chapitre II) suggéraient déjà une interprétation de cette nature ; à savoir l'existence d'une diversité de l'ITS chez un même individu.

Lorsque nous avons obtenu les jeux de données, les séquences nucléaires se sont révélées très variables. Cela a engendré des problèmes d'alignements dus à la forte divergence des séquences : nous nous sommes donc limités à la réalisation des alignements des 57 Basidiomycètes dans la région 5,8S qui est beaucoup moins variable (Bruns *et al.*, 1991 ; Hibbett et Vilgalys, 1993 ; Boidin *et al.*, 1998 ; Hibbett *et al.*, 2000 ; Moncalvo *et al.*, 2000 ; Selosse et Durrieu, 2004). L'arbre phylogénétique 5,8 S met en évidence des clades où les espèces tendent à se grouper selon les genres et selon la capacité à dégrader le bois en pourriture fibreuse ou cubique. La pourriture fibreuse s'applique aux champignons qui décompose le bois selon une seule direction d'attaque, réduisant celui-ci en une charpie formée de fibres parallèles, plus ou moins mêlées de mycélium ; c'est le cas dans notre étude pour les genres : *Trametes*, *Spongipellis*, *Phellinus*, *Cerrena*, *Ganoderma*, *Perenniporia*, *Polyporus*, *Oxyporus*, *Donkioporia*. La pourriture cubique est celle que montrent les bois attaqués selon trois directions perpendiculaires de clivage fragmentant la substance ligneuse en petits parallélépipèdes ; les espèces dans notre étude sont les genres : *Poria*, *Antrodia*, *Fomitopsis*, *Gloeophyllum* et *Coniophora*. Nous retrouvons ces résultats dans les études de

différents auteurs (Boidin *et al.*, 1998 ; Hibbett et Donoghue, 2001 ; Selosse et Durrieu, 2004).

Nous notons que deux clades bien distincts apparaissent regroupant les espèces en fonction de leur nature à dégrader le bois en pourriture cubique. Ces deux groupes de champignons de pourriture cubique regroupent respectivement les espèces des genres *Gloeophyllum* et les espèces des genres *Fomitopsis*, *Antrodia*, *Coniophora* et *Laetiporus*. Cette division en deux clades bien distincts pourrait s'expliquer par des caractères qui distinguent l'hyménium de *Gloeophyllum* des autres genres. En effet, *Gloeophyllum* possède un hyménium tubulé alors que l'hyménium des autres genres est granuleux. Par ailleurs le clade des *Gloeophyllum* est proche du genre *Trametes* dont l'hyménium présente des pores très fins. Nous notons que *Trametes* est également isolé de *Ganoderma*. Les auteurs Boidin *et al.* (1998) constatent aussi des positions similaires sans apporter d'hypothèse évolutive pour soutenir ces proximités taxinomiques apparentes. Dans cet arbre, nous observons que la plupart des espèces du genre *Trametes* sont proches des espèces des genres *Antrodia* et *Fomitopsis*, champignons de pourriture cubique. Boidin *et al.* (1998) ont déjà constaté des positionnements taxinomiques similaires.

Le regroupement de la plupart des genres nous incite à reconnaître des groupes importants et bien distincts comme les genres : *Phellinus*, *Gloeophyllum*, *Fomitopsis*, *Pycnoporus*, *Donkioporia*, *Ganoderma* et *Perenniporia* à l'exception des deux espèces de *Perenniporia medulla-panis* n° 4597-1 et 4597-2 qui se situent près de *Ganoderma*. Boidin *et al.* (1998) ont proposé de mettre en synonyme l'ordre des Ganodermatales avec celui des Pérenniporiales, à propos desquels Jülich (1981) écrivait d'ailleurs : « cet ordre est peut être relié aux Ganodermatales qui diffèrent cependant par leurs spores à endospore ornementée ». Par ailleurs, dans l'étude de Hibbett et Donoghue (1995), les *Polyporus* se situent dans ce taxon des Ganodermatales *sensu lato* et nous observons ce cas de figure pour le clade des *Perenniporia* contenant nos souches de *Perenniporia* et des *Polyporus* de référence. Les agaricales regroupant les genres *Lepista*, *Panellus*, *Tricholoma* et *Rickenella* figurent dans un clade bien distinct comprenant des Aphyllophorales ; ces positions ont été également constatées dans l'étude de Thorn *et al.*, (2000). La position de *Tricholoma*, Agaricale ectomycorhizienne, parmi les Polyporales confirme les analyses phylogénétiques réalisées par Moncalvo *et al.* (2000) : les Agaricales ectomycorhiziennes seraient issues de Polyporales. Enfin, la position de l'ectomycorhizien *Tomentellopsis* voisine de *Gloeophyllum* est retrouvée dans l'étude des auteurs Hibbett *et al.* (2000) qui suggèrent que certains champignons saprophytes deviennent ectomycorhiziens, puis retrouvent leur état saprophyte et inversement.

Le choix de ces espèces après BLASTn et la proximité phylogénétique que nous avons constatée vont tout à fait dans le sens des observations réalisées par ces auteurs.

Dans cette étude, nous mettons en évidence que le genre *Spongipellis* se positionne dans trois clades soutenus par des valeurs de *bootstrap* faibles (49% et 57%) : ces groupes sont donc proches ; cette proximité phylogénétique positionne nos souches de *Spongipellis*, agents de pourriture fibreuse, proches de *Phlebia*, champignons de pourriture cubique ; des résultats similaires sont présentés dans l'étude de Boidin *et al.* (1998). La valeur de *bootstrap* de 100% confirme sans ambiguïté la position très attendue et prévisible de notre souche *Spongipellis spumeus* n° 4566 très proche de la souche de référence *Spongipellis* AJ006671.

Les deux configurations similaires pour les genres *Trametes*, *Pycnoporus* et *Perenniporia* où *Perenniporia* est voisin de *Pycnoporus* et de *Polyporus* sont constatées également dans l'étude d'Hibbett et de Donoghue (1995).

Nous constatons que *Pleurotus*, une Agaricale connue pour ses caractères lignivores se positionne parmi des Aphyllophorales, position retrouvée dans l'étude de Thorn *et al.* (2000) suggérant dans ce cas de figure des transferts horizontaux. Enfin, nous remarquons que les valeurs de *bootstrap* des branches reliant les deux groupes dans la phylogénie des espèces du genre *Trametes* sont faibles, 47% et 59%, ce qui suggère que les différentes espèces occupent des positions proches entre elles.

De ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que des taxons identiques morphologiquement pourraient développer un mécanisme de spéciation (Bull *et al.*, 1993). Ce mode de spéciation pourrait se décomposer en plusieurs situations. Une première situation est qu'au cours du temps chacun de ces taxons accumule des différences génétiques du fait qu'ils sont soumis à des pressions sélectives différentes. Une deuxième situation est que la divergence entre deux taxons est telle qu'ils ne se croisent plus ; la spéciation a eu lieu, les deux taxons ont chacun le rang d'espèce. Une troisième situation est que la différenciation entre les deux taxons est insuffisante : les deux taxons s'homogénéisent alors par brassage génétique, il n'y a qu'une seule espèce. Dans ce modèle, l'accumulation de différences génétiques conduit à la formation progressive de nouvelles espèces qui pose de grands problèmes d'individualisation ; les lignées évolutives passant graduellement par des formes intermédiaires. Ainsi, entre deux espèces, il existe un continuum de sous-espèces très proches. Afin de définir les limites du concept d'espèces chez les champignons, les chercheurs ont utilisé des expériences de comptabilité sexuelles entre les populations, reprenant directement le concept de Mayr. Chez les Basidiomycètes, le mycélium est dicaryotique. La compatibilité sexuelle entre deux individus est déterminée par l'observation des premières étapes de croisement jusqu'à la formation de connexions mycéliennes (Brasier, 1992). Cependant,

l'isolement reproductif n'est pas systématiquement en accord avec les descriptions d'autres caractères spécifiques (Harrington et McNew, 1998). Ainsi dans le genre *Lentinula* de la famille des Agaricaceae, des espèces asiatiques ont été classées par des caractères phénotypiques de compatibilité sexuelle, mais des études phylogénétiques montrent que ces espèces seraient évolutivement différentes et appartiendraient à des taxons plus éloignés. Ces études montrent que des approches pluridisciplinaires sont nécessaires afin de définir les espèces pour les champignons et que l'on ne peut exclure des conclusions divergentes entre les caractères étudiés. Nos études moléculaires devraient être complétées d'études phénotypique et écologique afin de savoir si les séquences obtenues révèlent réellement la diversité spécifique des champignons étudiés. Harrington et Potter (1997) ont montré que des espèces différentes peuvent avoir la même séquence ITS. Inversement, les espèces *Armillaria gallica* et *A. calvescens* diffèrent par leur écologie et leur morphologie, alors que leurs séquences respectives sont identiques (Harrington et Wingfield, 1995). Ainsi, il arrive parfois que les analyses phylogénétiques basées sur des séquences d'ADN ne permettent pas de séparer des espèces proches.

Parmi les facteurs de spéciation, nous pouvons admettre que les fonctions enzymatiques impliquées dans la dégradation du bois puissent évoluer en pourriture fibreuse ou en pourriture cubique ou les deux à la fois (Cf. Chapitre II). C'est ainsi que chez les champignons hypogés certaines espèces sont apparues très vite à partir d'ancêtres à sporophores aériens (champignons à tubes ou à lamelles ; Bruns *et al.*, 1989).

De ces résultats, nous remarquons que les phylogénies des Basidiomycètes utilisant le fragment nucléaire ITS1, 5,8S et ITS2 confirment qu'il existe une variabilité plus ou moins importante entre les taxons étudiés (Moncalvo *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 2000) et que cette variabilité reste informative. Il serait envisageable de pouvoir redéfinir un gène pertinent à utiliser pour notre étude (gène mitochondrial, gène de la  $\beta$ tubuline ou l'ADNr 28S) afin de préciser les relations phylogénétiques entre ces espèces. Cependant les études comparatives entre les phylogénies obtenues à partir de gène nucléaire et mitochondriaux pour un même taxa de champignon sont peu nombreuses (Bruns et Szaro, 1992 ; Johnson, 1999 ; Moncalvo *et al.*, 2000) : ces auteurs montrent que les taux d'évolution moléculaire des deux gènes (nucléaire et mitochondrial) peuvent être différents, même entre des espèces très proches.

De plus, il serait intéressant d'étudier plusieurs gènes pour au moins deux raisons. D'une part, l'arbre obtenu par l'étude d'un gène ne représente pas forcément la phylogénie de l'espèce, et les phylogénies obtenues à partir des séquences de différents gènes peuvent être contradictoires (Felsenstein, 1995 ; Maddison, 1997). D'autre part, des études empiriques et



théoriques (Huelsenbeck, 1995 ; Poe et Swofford, 1999) ont montré que les phylogénies obtenues étaient plus solides lorsque l'on augmente le nombre de caractères informatifs dans les analyses, dans la mesure où les données sont congruentes entre elles. La congruence entre des données de différentes origines a été la source de nombreux débats entre les systématiciens et les phylogénéticiens (Bull *et al.*, 1993 ; Miyamoto et Fitch, 1995). Dans notre étude, l'analyse des données peut révéler des incongruences pour plusieurs raisons, notamment par des différences de modes d'évolution (Bull *et al.*, 1993) ou encore par les différences de leur histoire phylogénétique en particulier le polymorphisme (Doyle, 1992).

### III.5. Conclusions

Dans cette étude, l'ADNr 5,8S permet d'analyser et de conclure sur les relations phylogénétiques entre des espèces de champignons dégradant le bois. Cependant, l'étude comparée des ITS (ITS1-5,8S-ITS2) de 57 Basidiomycètes, tous des Aphyllophorales, amène plusieurs remarques au niveau des genres et des espèces.

Dans ce travail nous avons essayé de donner une dimension phylogénétique à ces taxons : chaque taxon a été considéré comme occupant un rang générique qui rassemble des espèces. Ce point de vue est illustré en détail avec les genres et les espèces qui les composent. L'emboîtement des branches entre elles soutenues par des valeurs de bootstrap souvent élevées (supérieure à 80%) permet d'émettre des hypothèses sur la parenté entre les genres. Cette analyse, à partir de nos 57 séquences et de 113 séquences de référence, suscite de très nombreuses remarques. L'aspect de l'hyménium, hydne (*Stereum*), poré (*Hexagonia*) ou même lamellé (*Lenzites*), qui a toujours servi, étant perceptible à l'œil nu, à fixer les grandes lignes de la classification ne peut plus être un caractère de reconnaissance et d'identification fiable. En effet, les Porés (*Trametes*, *Perenniporia*, *Donkioporia*, *Polyporus*, *Heterobasidion*, etc.), assez nombreux dans notre étude, sont partagés sur plusieurs branches ; il en est de même des Hydnes. De même, le port du basidiome, étalé, étalé-réfléchi, dimidié, substipité n'est pas un critère de premier ordre pour définir ou distinguer les genres ou les espèces. A contrario, l'importance d'un caractère à dégrader le bois en pourriture cubique et fibreuse est mise en évidence.

C'est ainsi qu' à partir de nos échantillons identifiés au laboratoire et à partir de carpophores, les séquences ont été considérées comme provenant d'espèces distinctes. L'utilisation des séquences moléculaires pour caractériser une espèce est un outil intéressant pour définir des espèces mais pas toujours suffisant. En revanche, l'utilisation de séquences d'ADN reste une étape incontournable pour comprendre les processus de diversification des espèces de

champignons. Au regard de nos résultats, il semble indispensable de ne pas dissocier les approches moléculaires d'autres caractérisations biologiques afin de définir une espèce.

Actuellement, le nombre de champignons décrit se compte en milliers d'espèces, environ 72 000 selon Kirk *et al.* (2001) pour un total excédant probablement 1,5 million selon Hawksworth (1995). La description de nouvelles espèces de champignons nécessite désormais une description macroscopique et moléculaire des carpophores. Cependant, certains champignons ne fructifient pas ou rarement (Strullu, 1985). Dans ce contexte, la caractérisation moléculaire de 57 espèces de champignons lignivores réalisée lors de cette étude génère des données permettant de compléter une base de séquences composée majoritairement de taxons qui ne dégradent pas le bois.

Dans cette étude, certains champignons montrent une diversité moléculaire inattendue parmi des groupes supposés connus. Dans l'avenir, l'ajout de nouveaux taxons, surtout issus des régions tropicales encore peu échantillonnées et l'utilisation de nouveaux gènes conduiront sans doute à de profonds remaniements dans la classification et dans la systématique mycologique. Le retour sur les caractères morphologiques, à partir des phylogénies obtenues, générera des travaux éclairants sur l'évolution adaptative des champignons dégradant le bois.

## **CHAPITRE IV**

**MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE POUR UNE  
DETECTION PRECOCE «IN SITU» DE CHAMPIGNONS  
DANS LE BOIS.**

**IN SITU MOLECULAR DETECTION OF SOME WHITE-ROT  
AND BROWN-ROT BASIDIOMYCETES INFECTING  
TEMPERATE AND TROPICAL WOODS.**

## **CHAPITRE IV : Mise au point d'une méthodologie pour une détection précoce « *in situ* » de champignons dans le bois.**

### **IV.1. Introduction**

Dans le bois, la présence de certaines espèces de champignons n'est décelable macroscopiquement qu'à partir d'un stade avancé de développement. L'utilisation de bois infestés peut provoquer, soit des altérations visibles préjudiciables à la commercialisation, soit une diminution des propriétés physiques et mécaniques préjudiciables à la pérennité des ouvrages (Fougerousse, 1979 ; Déon, 1986). En effet, cette altération du bois par les champignons qui est la cause d'importants préjudices financiers, le rend impropre à la plupart de ses utilisations habituelles. Pour lutter contre ces champignons, des quantités très importantes de fongicides à très large spectre sont utilisées chaque année. Ces produits ont un effet néfaste sur l'environnement avant, pendant et après leur utilisation. Il apparaît donc nécessaire de rechercher et de développer un outil de détection précoce des champignons, ce avant qu'ils n'aient atteint un stade avancé de développement dans le bois ; cette détection précoce permettra une intervention rapide et, par voie de conséquence, une optimisation de l'utilisation des fongicides destinés au traitement.

Les techniques actuelles pour détecter les pourritures dans un bois incluent en général les examens microscopiques (Wilcox, 1964 ; Stalpers, 1978), l'isolement des champignons à partir des bois infestés (Nobles, 1965 ; Stalpers, 1978), l'utilisation de colorants chimiques (Eslyn, 1979), les méthodes acoustiques (Ouis, 2000) et électroniques (Dunlap, 1981 ; Shortle, 1982 ; Ross *et al.*, 1994). Les sondes mécaniques et la radiographie sont encore employées pour détecter et contrôler l'état d'avancement de la pourriture dans un bois en particulier dans les arbres. Cependant les attaques précoces par les champignons, car elles n'altèrent pas les propriétés physiques et mécaniques des bois, sont très difficiles à évaluer par ces méthodes (Higley *et al.*, 1994). Les colorations directes dans le bois permettent de déceler très tôt la présence de champignons mais les interprétations restent souvent subjectives et incertaines (Higley *et al.*, 1994 ; Clausen et Ferge, 1995). L'isolement des champignons à partir du bois est simple (Nobles, 1965) mais l'emploi d'antibiotiques inhibant les moisissures et les bactéries entrave la croissance normale du champignon et cette croissance demande alors beaucoup plus de temps : de l'ordre de trois semaines. Les sondes mécaniques mesurant la résistance mécanique des bois détectent la pourriture uniquement si celle-ci infeste plus de 35% la masse du bois (Morris et Dickenson, 1984). En général, l'utilisation de ces techniques ne donnent jamais une réponse immédiate, un délai d'au moins une huitaine de jours est

pratiquement inévitable pour savoir si nous sommes en présence de champignons dans un bois (Higley *et al.*, 1994).

Actuellement, aucun test de détection rapide et performant n'existe pour révéler les champignons dans le bois. Etant donné l'ampleur des problèmes causés par ces micro-organismes dans les industries du bois, il est nécessaire pour celles-ci de disposer d'un test à la fois rapide, simple d'utilisation, spécifique, automatisable, et doté d'un seuil de détection performant et bas. Une technique qui semble réunir toutes les qualités requises consiste en la mise au point d'une méthode permettant par le biais de la PCR, d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN génomique.

Dans ce chapitre, nous décrivons une méthode d'identification précoce de champignons dégradant le bois, à partir des critères de classification classique généralement faite à partir d'observations morphologiques, physiologiques et biochimiques. Cette méthode combine donc la sensibilité et la fiabilité de la PCR et l'utilisation des banques de séquence nucléotidiques internationales.

#### **IV.2. Détection moléculaire *in situ* de Basidiomycètes de pourriture blanche et de pourriture brune infectant des bois tempérés et tropicaux.**

Les résultats et les protocoles concernant cette méthode d'identification précoce dans le bois sont présentés dans une publication acceptée le 8 juillet 2004 au *Canadian Journal of Forest Research*.



## ***In situ* molecular detection of some white-rot and brown-rot Basidiomycetes infecting temperate and tropical woods.**

Alba Zaremski<sup>a,b</sup>, Marc Ducouso<sup>b,\*</sup>, Odile Domergue<sup>b</sup>, Joel Fardoux<sup>b</sup>, Cécile Rangin<sup>b</sup>, Daniel Fouquet<sup>a</sup>, Hélène Joly<sup>c</sup>, Christian Sales<sup>a</sup>, Bernard Dreyfus<sup>b</sup> and Yves Prin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>: Laboratoire de Préservation, CIRAD TA10/16, 73 rue Jean-François Breton, F-34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>b</sup>: Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 (CIRAD/INRA/IRD/Agro-M/UM2) TA 10/J, F-34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>c</sup>: Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175 (CIRAD/Agro-M/ CNRS/ UM1/UM2/UM3), 1919 Route de Mende 34293 Montpellier Cedex, France.

\* Corresponding author. Tel: 33 (0)4 67 59 37 63, Fax: 33 (0)4 67 59 38 02. e-mail:

[marc.ducouso@cirad.fr](mailto:marc.ducouso@cirad.fr)

### **Abstract**

Wood decay, white-rot and brown-rot fungi have a major economic impact on commercial and manufactured tropical and temperate woods. The aim of this study was to design a molecular method, coupled with PCR and DNA sequencing, to enable early identification of various forms of fungal decay in various types of wood. The resulting tool could be used to certify the healthiness of commercial woods and also to make more efficient use of chemicals and thus reduce their negative environmental impact. Sapwood plates of *Distemonanthus benthamianus*, *Fagus sylvatica*, *Lophira alata*, *Pinus sylvestris* and *Pycnanthus angolensis* were incubated *in vitro* in the presence of *Fibroporia vaillantii*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes versicolor* according to the EN 113 standard method. Average weight losses ranging from 2.6 to 25.0% indicated that all wood samples had been actually infected and enabled us to test the reliability of our method. PCR products were obtained in 24 out of 25 combinations and DNA sequences in 21 out of the 24 fungal PCR products. DNA sequences obtained from infected wood were compared with sequences from pure strains, thus confirming the identity of the infecting strains with 100% similarity for an average of 412 bases.

**Key words: Brown rot, White rot, Fungi, Molecular detection**

### **Introduction**

Wood decay fungi play a major role in the functioning of terrestrial ecosystems by recycling carbon sequestered in wood falls (Hibbett and Donoghue 2001). However, fungal decays are not limited to natural ecosystems but also have a dramatic impact on all commercial and manufactured tropical and temperate wood uses. Wood decay is generally known to have two

different forms in Homobasidiomycetes, i.e. white-rot fungi degrade lignin and the carbohydrates cellulose and hemicellulose, while brown-rot fungi only degrade these carbohydrates. Both forms cause serious damage and prompt treatments involving various non-chemical wood protection methods but also using toxic broad-spectrum chemical products that are often applied preventively on an empirical basis. Wood is also depreciated by sapstaining fungi, which colonize wood without degrading it. They generally induce a blue to black wood staining, thus seriously limiting potential uses of the wood. Breuil and her co-workers have conducted targeted studies to gain insight into this latter group of fungi (Kim et al. 1999; Schroeder et al. 2001, 2002). Chemical controls could be more specifically and efficiently focused via early detection and identification of fungi in woods, thus reducing the negative environmental impacts of these toxic chemicals. However, most valuable woods are tropical, with dark-coloured heartwood. Dark colours are generally due to phenolic compounds, which can inhibit the activity of enzymes like Taq polymerase, which is used for PCR techniques, therefore reducing the possibility of detection to white or pale-coloured wood. Hence, studies on fungus detection in decayed woods are generally limited to white softwood (e.g. Jasalavich et al. 2000; Adair et al. 2002).

This study was aimed at designing molecular methods to enable detection of various forms of fungal decay in different types of wood (temperate, tropical, dark-coloured or white). These methods could ultimately be applied in every step of wood trading, manufacturing and building.

### **Materials and Methods**

The characteristics of the wood and fungal materials are described in Table 1. Fungal strains (CIRAD-Forêt wood-decaying fungus collection) were chosen for their decay type (white- or brown-rot) and geographical origin (temperate or tropical). The DNA extractions and PCR conditions for pure fungal strains were as described in Guerin-Laguet et al. (2003), and the sequencing conditions were as described in Martin et al. (2002). The sequences have been deposited at the National Center for Biotechnology Information at the National Institute of Health, Bethesda, Md., USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) the accession numbers are given in Table 1. Commercial woods of temperate and tropical origins, with various colours, and degrees of hardness and natural durability were tested. Sapwood samples were prepared directly from logs in the CIRAD-Forêt experimental sawing unit (ISO 17025 certification).

#### *Inoculation of wood samples:*

After 10 days of growth on malt agar medium, fungal mycelium covered the agar. Sterile

(autoclaved at 120°C for 20 min) sapwood samples (50 x 10 x 5 mm) were dried and weighed before being aseptically deposited on the mycelium. After 8 subsequent weeks of culture, the wood samples were cleared of surface mycelium, dried for 4 days at 30°C, and weighed. Surface mycelium was removed using a straight scalpel blade. Weight loss was calculated, with four replicates, for each wood/fungus combination on the basis of the difference between initial and final dry weights; the standard deviation was also calculated. Inoculation of wood plates and monitoring of weight loss were carried out in the CIRAD-Forêt wood preservation laboratory (ISO 17025 certification) according to the EN 113 standard, except: i- sapwood was used instead of heartwood because sapwood is generally more susceptible to fungal decay, and under natural conditions fungal attacks always start in the sapwood and then eventually spread to the heartwood; and ii- the length of the culture period was reduced to 8 weeks in order to limit wood decay and to place us in the frame of early detection of wood attacks by a limited quantity of fungi.

*DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing conditions:*

Using a scalpel blade, on the infected wood plates, the first half millimetre was removed on one-third of the area on one side, thus enabling easy access to the infected part of the wood that was totally free of surface mycelium. Some of the inner part of one randomly chosen infected wood sample (among four) was then ground using an electric drill fitted with a cone-shaped tungsten carbide mill head. Between each sample, the drill head was carefully cleaned and dipped in 95° ethanol and flamed. 100 mg of wood/fungus powder was placed in 5 ml extraction buffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% MATAB (mixed alyltrimethylammonium bromide, Sigma); 1% PEG 6 000; 0.5% NaSO<sub>3</sub>) at 74°C, vortexed for 10 s and kept for 20 min at the same temperature. After centrifugation (3 200 g for 15 min), the cell lysate was extracted four times with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, by vol.). The upper phase was supplemented with the same volume of isopropanol, centrifuged (3 200 g for 5 min) and the pellet washed in 1 ml of 70° ethanol. After centrifugation (4 000 g for 10 min), the pellet was dried at room temperature and solubilised at 50°C for 60 min in 50 µl of 10 mM Tris EDTA buffer.

PCR was targeted on the internal transcribed spacer of the ribosomal operon using ITS1 and ITS4 fungal primers (White et al. 1990). PCR reactions were conducted in a Perkin Elmer Genamp 2400 Thermocycler with the following temperature program: initial denaturing at 94°C for 5 min followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 90 s and a final extension step at 72°C for 7 min.

The PCR fragments were purified and sequenced according to the methods described in Zakhia et al. (2004). Infected wood DNA sequences were aligned and compared to sequences from pure fungal cultures. Table 2 shows the number of DNA bases obtained from infected wood/fungus powder over the number of common bases between infected wood/fungus powder and pure fungal cultures.

## Results and Discussion

### **Weight loss:**

Weight loss was less than 20% for most of the different combinations tested (Table 2). Two woods (*F. sylvatica* and *P. angolensis*) were particularly susceptible to both white and brown rot. The three remaining woods, i.e. *D. benthamianus*, *L. alata* and *P. sylvestris*, showed very little fungal attack and, with the exception of *P. sylvestris* (Ferraz et al. 2001, Mswaka and Magan 1998), are known to have good natural resistance to fungal attack. Mswaka and Magan (1998) obtained weight loss ranging from 20 to 90% when using *Trametes* spp. to infect *P. sylvestris*, with *T. versicolor* decay being over 60%. These authors attributed this high weight loss to the short period of time between strain isolation and wood testing, thus minimizing the decline in enzymatic activity classically observed after years of culture. Tanesaka et al. (1993) reported weight loss of below 20%, which reflected poor fungal development in the wood, as observed in our study. The *C. puteana* strain isolated in 1930 by J. Liese and designated as "Normstamm1, Eberswalde 15" in German wood preservative standard DIN 52176 and in EN113 showed reduced growth with all woods tested. Schmidt et al. (2002) reported that this strain is problematic in wood decay tests because of its possible subsequent degeneration during culturing after isolation. Göller and Rudolph (2003) even showed by RAPD analysis that some isolates designated as Ebw. 15 are actually subcultures of the British isolate FPRL 11e. The *Gloeophyllum trabeum* and *T. versicolor* strains used in this study are also referenced strains in the wood preservative standard EN113. This weight loss test allowed us to check that all the wood samples were actually infected and that the various infection levels constituted excellent material for testing the reliability of our method on five different woods.

### **DNA analyses:**

ITS-PCR products were obtained in 24 out of 25 combinations, with fragment sizes ranging from 600 to 700 bp. The recalcitrant combination was *G. trabeum*/*P. angolensis*. 21 out of 24 rDNA-ITS sequences were obtained (Table 2). Sequencing allowed us to confirm the identity of the infecting strains with a mean similarity of 412 bp, thus establishing the feasibility of the method with different woods and decay fungi. Failed DNA determinations ("nd" in Table 2) and successful determinations could not be related to weight losses, i.e. fungal attack levels.

They would be more related to the wood species and type of fungal decay, as is the case with *Pycnanthus* samples and the three brown-rot fungi, although *Pycnanthus* wood is quite pale coloured and considered susceptible (Table 1). Our *C. puteana* and *G. trabeum* sequences were very close to those deposited by Schmidt and Moreth (2002), whereas the *F. vaillantii* sequence was not as comparable with respect to the ITS 1 and ITS2, indicating a possible abusive use of the species epithet “*vaillantii*”. Since no sequence from type herbarium specimen is available for *F. vaillantii*, it is currently hard to determine which use of the species epithet “*vaillantii*” is correct. More molecular and phylogenetic analyses would be necessary to validate the relationship between DNA sequences and taxonomy of wood decaying fungi.

Few data are available on the feasibility of molecular methods to directly assess infected woods. Jasalavich et al. (2000) identified fungal isolates inoculated in the softwoods *Picea abies*, *Pinus contorta* and *Tsuga heterophylla* using PCR/RFLP, like Adair et al. (2002) did with *P. contorta* and *T. heterophylla* wood chips. Moreth and Schmidt (2000) characterized fungi from infected woods through species-specific PCR primers using mycelium or sporophores growing in infected wood and not wood-fungus combinations. Vainio and Hantula (2000) used denaturing gradient gel electrophoresis to successfully identify wood decaying fungi from infected Norway spruce stumps. Through hybridization with labelled membrane-linked oligonucleotides, Oh et al. (2003) successfully identified fungi from infected "wood samples from field tests" but without naming the woods. These studies were limited to white or pale-coloured gymnosperm woods, so there was no indication concerning the feasibility of using these different molecular techniques with coloured tropical woods. The use of relatively durable woods and monitoring of weight loss enabled us, using a PCR-sequencing combination, to rapidly detect the presence of low quantities of wood decaying fungi inducing different types of rot in a wide range of woods of different qualities.

#### **Acknowledgements:**

**We express our warmest thanks to Claude Daigremont for preparing the wood samples and to David Manley for linguistic revision of the manuscript.**



## References:

- Adair, S., Kim, S.H., and Breuil, C. 2002. A molecular approach for early monitoring of decay Basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 117-122.
- Ferraz, A., Rodriguez, J., Freer, J., and Baeza, J. 2001. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 31-34.
- Göller, K. and Rudolph, D. 2003. The need for unequivocally defined reference fungi – Genomic variation in two strains named as *Coniophora puteana* BAM Ebw.15. *Holzforschung* **57**: 456-458.
- Guerin-Laguette, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C., and Mousain, D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* **13**: 17-25.
- Hibbett, D.S., and Donoghue, M.J. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Syst. Biol.* **50**: 215-242.
- Jasalavich, C.A., Ostropskyand, A., and Jellison, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified gene encoding rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4725-4734.
- Kim, S.H., Uzunovic, A., and Breuil C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma picea* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 287-290
- Martin, F., Diez, J., Dell, B., and Delaruelle, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* **153**: 345-357.
- Moreth, U., and Schmidt, O. 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* **54**: 1-8.
- Mswaka, A.Y., and Magan, N. 1998. Wood degradation, cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. *Mycol. Res.* **102**: 1399-1404.
- Oh, S., Kamden, P., Keathley, D., and Han., K.H. 2003. Detection and species identification of wood-decaying fungi by hybridization of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes with PCR-amplified fungal ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Holzforschung* **57**: 346-652.
- Schmidt, O., Grimm, K., and Moreth, U. 2002. Molecular identity of species and isolates of the *Coniophora* cellar fungi. *Holzforschung* **56**: 563-571.

- Schmidt, O., and Moreth, U. 2002. Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Sci. Technol.* **36**: 429-433.
- Schroeder, S., Kim, S.H., Cheung, W.T., Sterflinger K., and Breuil C. 2001. Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 163-167.
- Schroeder, S., Kim, S.H., Lee, S., Sterflinger K., and Breuil C. 2002. The  $\beta$ -tubulin gene is a useful target for PCR-based detection of an albino *Ophiostoma piliferum* used in biological control of sapstain. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 793-801.
- Tanesaka, E., Masuda, H., and Kinugawa, K. 1993. Wood degrading ability of Basidiomycetes that are wood decomposers, litter or mycorrhizal symbionts. *Mycologia* **85**: 347-354.
- Vainio, E.J., and Hantula, J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **104**: 927-936.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. eds.). Academic Press Inc., San Diego, Cal pp. 315-322.
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P. 2004. Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *System. Appl. Microbio.* **27**: 380-395.

**Table 1: Characteristics of the fungal strains (Basidiomycetes) and wood samples used in this study**

*Material*      *Characteristics*

<b>Fungal strain</b>	<b>Ref</b>	<b>Origin</b>	<b>Rot type</b>	<b>Access nb</b>
<i>Fibroporia vaillantii</i> (DC.: Fr.) Parmasto	4491	France	brown	AY673075
<i>Coniophora puteana</i> (Schumach.) P.Karst	4N(Ebw. 15)	Germany	brown	AY673079
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.: Fr.) Murrill	900.73	CBS, Netherlands.	brown	AY673077
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.: Fr.) Murrill	27.0	New Caledonia	white	AY673078
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	34671	Portugal	white	AY673076
Wood sample	Ref	Origin	Colour	Durability*
<i>Distemonanthus benthamianus</i> Baill.	18912	Côte d'Ivoire	yellow	+/-
<i>Fagus sylvatica</i> L.	nd	France	light-brown	+/-
<i>Lophira alata</i> Banks ex. Gaertn. F.	25614	Gabon	dark-red	+
<i>Pinus sylvestris</i> L.	nd	France	white	-
<i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Exell.	25970	Gabon	white-pink	-

\*Durability according to classes defined in European standard EN 350-1: (-) susceptible, class 5; (+/-) medium, class 3; (+) durable, class 2.

**Table 2: Lengths (in bp) of pure fungal strain sequences, weight loss (mean  $\pm$  standard deviation) and DNA sequence homology expressed in number of common bases when comparing sequences obtained from infected wood fungal DNA and sequences from the pure fungal strain.**

Fungal strain and pure culture	<i>Fibroporia vaillantii</i> (602)		<i>Coniophora puteana</i> (573)		<i>Gloeophyllum trabeum</i> (553)		<i>Pycnoporus sanguineus</i> (577)		<i>Trametes versicolor</i> (471)	
DNA sequence length (bp)	WL	DNA	WL	DNA	WL	DNA	WL	DNA	WL	DNA
Wood sample										
<i>Distemonanthus</i>										
<i>benthamianus</i>	3.5 $\pm$ 0.20	387/387	3.1 $\pm$ 0.33	410/410	2.5 $\pm$ 0.67	416/416	3.2 $\pm$ 0.19	412/412	3.2 $\pm$ 0.48	418/418
<i>Fagus sylvatica</i>	16.0 $\pm$ 3.01	440/440	4.4 $\pm$ 1.12	nd	16.7 $\pm$ 2.74	425/425	11.2 $\pm$ 1.31	392/392	16.8 $\pm$ 1.18	370/370
<i>Lophira alata</i>	7.3 $\pm$ 1.84	416/416	3.9 $\pm$ 0.71	416/416	3.2 $\pm$ 0.19	418/418	5.3 $\pm$ 0.38	410/410	4.0 $\pm$ 0.44	412/412
<i>Pinus sylvestris</i>	3.4 $\pm$ 1.36	477/477	3.3 $\pm$ 0.07	427/427	2.6 $\pm$ 0.32	421/421	3.3 $\pm$ 0.35	376/376	3.6 $\pm$ 0.34	414/414
<i>Pycnanthus angolensis</i>	25.0 $\pm$ 4.02	nd	3.2 $\pm$ 0.16	nd	8.6 $\pm$ 1.04	nd	18.8 $\pm$ 4.36	380/380	13.7 $\pm$ 0.43	420/420

Legend: nd: not determined because no sequence was obtained from the wood sample, WL: weight loss, DNA: DNA homology between fungal sequences of infected wood sample and pure cultures

### IV.3. Conclusions et perspectives

Un contrôle efficace du développement des champignons dans les bois mis en œuvre nécessite des connaissances de plus en plus fines sur l'organisme en question au niveau de sa physiologie, de sa génétique, de son mode de propagation et de ses stratégies d'infection mais implique également l'existence d'une méthode de diagnostic et de détection précoce.

Dans cette mise au point d'une méthode d'identification précoce de champignon dans le bois, la cible est l'ADN ribosomique du micro-organisme. Cette méthode basée sur la PCR et le séquençage est très spécifique. Ainsi, l'analyse du polymorphisme moléculaire de l'ITS de l'ADN ribosomique, marqueur neutre, permet à partir d'un bois déterminé, de s'assurer du développement d'une souche connue préalablement inoculée dans ce bois. Cette technique est rapide et permet d'obtenir des seuils de détections assez bas en terme de développement du champignon.

La prochaine étape consistera en la mise au point de marqueurs moléculaires spécifiques fonctionnels au niveau de la souche fongique par l'étude des protéines enzymatiques impliquées dans la dégradation des bois. En effet, la dégradation du bois implique différents mécanismes enzymatiques selon les types de pourritures (lignine peroxydases, Mn-peroxydases, cellulases, etc.) et face à la diversité des organismes et des systèmes enzymatiques mis en jeu lors de la dégradation fongique du bois, l'obtention de marqueurs spécifiques (sondes moléculaires : ARNribosomique, enzymes particulières, etc.) contre ces mêmes pathogènes fongiques permettra de diagnostiquer et de localiser avec précision la présence d'un champignon dans les bois avant même l'apparition d'altération du bois.

Nous recherchons maintenant à partir d'un bois infesté, à trouver la nature de l'attaque, la position phylogénétique du champignon responsable et *in fine* son identification. La fiabilité de l'identification, une fois la présence du champignon décelée, demande quant à elle à être vérifiée au regard des méthodes plus classiques : identification à partir de mise en culture jusqu'à l'obtention de carpophore en laboratoire.

La mise en place d'un test de routine pour les industries du bois consistera à vérifier la présence d'une infestation du bois par un champignon. Cette présence sera recherchée par PCR avec des amorces fonctionnelles et neutres. En cas d'absence d'infestation, l'étude sur l'échantillon de bois est arrêtée, le bois est à considérer comme sain.

En cas d'infestation décelée, l'étude sur l'échantillon de bois passe à la phase d'identification de l'espèce à l'origine de cette infestation. Cette identification du champignon présent dans



l'échantillon est alors réalisée par une identification moléculaire par PCR/séquençage neutre et fonctionnel/BLAST).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de normes établies pour les contaminants fongiques dans un bois. Diverses études pourront être conduites, comme déterminer la quantité maximale de champignons tolérable dans un bois pour ne pas aboutir à terme à une dégradation de ses propriétés physiques et mécaniques.

Il serait intéressant de développer une méthode applicable à l'évolution de la fonction qui provoque la pourriture fibreuse ou cubique chez les Basidiomycètes lignivores. Un test phylogénétique consisterait à reconstruire une phylogénie avec nos séquences de basidiomycètes connues en ajoutant la séquence de la souche que l'on veut étudier. Suivant le positionnement de la souche dans la phylogénie, on pourra obtenir plusieurs informations. Si la souche étudiée se place dans un clade contenant des souches dont le type de pourriture est connu et ceci avec une forte valeur de bootstrap, on considère que la souche produit une pourriture de même type. Si la souche forme un clade à part de toutes les autres séquences, deux possibilités se présentent : soit la souche produit un nouveau type de pourriture ou est en cours d'évolution (passe de pourriture cubique en pourriture fibreuse, ou le contraire, voir les deux types de pourriture en même temps), et alors son positionnement est dû aux contraintes structurales ; soit la souche appartient à une lignée taxonomique éloignée des basidiomycètes connus ; soit les deux (structure des protéines de dégradation et taxonomie nouvelle).

Ce test permettrait de s'affranchir du signal phylogénétique lié à la taxonomie des souches et de prédire le type de pourriture de souches récemment caractérisées (nouvelles espèces) ou isolées et non étudiées.

**CONCLUSION GÉNÉRALE  
ET  
PERSPECTIVES**

## Conclusion générale et perspectives

Le bois est un produit végétal complexe qui, très tôt dans l'Histoire de l'humanité, a acquis le statut de "Matériaux". Les particularités de son organisation tissulaire et cellulaire, sa composition chimique et l'identité génétique de chaque espèce conditionnent ses propriétés parmi lesquelles sa sensibilité vis-à-vis des agents biologiques. En effet, champignons et insectes attaquent le bois, brisant sa structure cellulaire et altérant ses caractéristiques physiques et esthétiques. Ainsi, les champignons de pourritures cubique ou fibreuse en utilisant les différents constituants du bois comme source carbonée engendrent sa dégradation en provoquant des altérations profondes et irréversibles de toutes ses propriétés, couleur, dureté, qualités mécaniques... Les propriétés catalytiques de ces champignons, essentielles au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes terrestres, représentent une nuisance grave pour les bois mis en service.

Afin de mieux connaître les organismes impliqués dans ces dégradations nous avons caractérisé des souches de champignons lignivores de la collection du Cirad en utilisant les régions de l'ADN ribosomique nucléaire comprenant les parties ITS1, 5,8S et ITS2. Ces portions de l'ADN fongique ont été choisies, entre autres parce qu'elles sont présentes en de multiples copies à l'intérieur du génome et comportent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ces propriétés font que la plupart des données existant actuellement concernent cette région de l'ADN ; de la sorte, ses variations sont relativement bien connues chez de nombreux organismes, notamment des champignons.

Afin de mettre en évidence la variabilité de ces portions génomiques chez 98 souches de la collection du Cirad, deux méthodes ont été utilisées : la PCR/RFLP et la comparaison de séquences par BLASTn.

La PCR/RFLP est une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse sur gel de la taille de fragments de restriction issus d'une molécule d'ADN ; cela indépendamment du recours aux caractères morphologiques macro- et microscopiques des sporophores nécessaires à l'identification des genres et espèces. L'utilisation de cet outil nous a permis de caractériser simplement et rapidement la plupart des souches étudiées grâce à l'obtention de profil de restrictions sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Outre sa sélectivité, un des avantages majeurs de cette technique est qu'elle permet de travailler sur des quantités infimes de matériels, quelques milligrammes de mycélium. Cependant on constate que certaines souches s'avèrent difficiles voire impossibles à distinguer en raison des profils de restriction

identiques entre eux. De plus, nous avons aussi mis en évidence une marge d'erreur pouvant atteindre 12 %, dans la lecture sur gel des poids moléculaires des molécules d'ADN. Enfin cette méthode requière la constitution d'une base de données dont l'utilisation reste soumise à une part d'interprétation qui permet difficilement de travailler sur un matériel inconnu de la banque de données. Cette technique simple et rapide est efficace pour suivre des souches connues dans des essais contrôlés, mais assez peu opérationnelle pour l'exploration de la biodiversité et la caractérisation de nouvelles souches.

L'analyse par BLASTn des séquences du fragment d'ADN génomique amplifié avec les amorces ITS1 et ITS4 nous a permis de placer les limites résolutes de ce fragment pour la caractérisation de ces souches. Ainsi, nous avons pu montrer que la variabilité de ce fragment, en particulier pour les portions ITS1 et 5,8S bien que toujours dépendante de la qualité des séquences de la banque de séquences est souvent suffisante pour caractériser le niveau taxinomique du genre et de l'espèce de la souche. Nous avons également montré que l'utilisation des séquences d'ITS présente plusieurs avantages, notamment une bonne reproductibilité d'obtention des séquences permettant une détermination à une base près de la longueur du fragment amplifié, à la différence de la lecture sur gel qui peut conduire à une erreur de quelques dizaines de bases. L'existence d'une importante quantité de séquences en banque de données est également un avantage pour l'exploration de la diversité des champignons qui dégradent le bois.

Cette caractérisation taxinomique de souches de la collection du Cirad nous a permis d'envisager d'explorer les liens de parenté phylogénétiques entre espèces de champignons dégradant le bois et notamment de tester un éventuel lien entre des séquences d'ADN réputées neutres et des séquences codant pour des activités enzymatiques et aussi de poser les bases méthodologiques pour le développement d'un outil de détection précoce de champignons dans un bois.

L'étude des relations phylogénétiques de 57 séquences des souches de la collection du Cirad et de 113 séquences de référence (Genbank) à partir de l'ADNr 5,8S suscite de très nombreuses remarques. Par exemple, l'aspect perceptible à l'œil nu de l'hyménium, hydne (*Stereum*), poré (*Hexagonia*) ou lamellé (*Lenzites*), ou le port du basidiome, étalé, étalé-réfléchi, dimidié ou substipité qui ont servi à établir les grandes lignes de la classification ne sont pas congruents avec la phylogénie de l'ADNr 5,8S. Ces « anomalies » au moins certaines d'entres-elles nous permettent de suggérer l'existence de transferts horizontaux de matériels génétiques. Il convient donc de ne pas utiliser les seules données de séquençage de l'ITS pour l'identification des champignons dégradant le bois. Nous avons également mis en évidence

que les souches étudiées ayant la capacité à dégrader le bois en pourriture cubique se répartissent en deux clades distincts suggérant des apparitions à au moins deux reprises au cours de l'évolution, de la capacité des champignons à dégrader le bois en pourriture cubique. L'analyse phylogénétique des ITS entiers (ITS1-5,8S-ITS2) sur des groupes ciblés nous a permis de confirmer la répartition en deux clades distincts des souches de pourriture cubique ainsi que l'hypothèse de transferts horizontaux de matériels génétiques entre espèces. Ce dernier point mérite des études plus approfondies afin de prouver l'existence de ces transferts. L'utilisation de séquences d'ADN reste une étape incontournable pour comprendre les processus de diversification des espèces de champignons. Toutefois, au regard de nos résultats, il semble indispensable d'associer les approches moléculaires avec la caractérisation biologique afin de caractériser et déterminer une espèce.

Les méthodes visuelles et physiques ne permettent pas une détection et une identification précoces des champignons présents dans un bois avant que l'altération du matériau soit profonde et irréversible. Nous avons montré expérimentalement que le séquençage permet une détection à un stade peu avancée de l'attaque et une identification parfaite de la souche inoculée, cela dans des bois très différents. Cette technique rapide permet de détecter la présence du champignon inoculé malgré des pertes de masses du bois très faibles, de l'ordre de quelques pourcents traduisant un très faible niveau d'attaque du bois par le champignon. Cela dit, les analyses de la variabilité des l'ITS que nous avons réalisées nous indiquent clairement les limites d'utilisation de ce marqueur pour la détection, la caractérisation et *in fine* l'identification d'un champignon a priori inconnu dans un bois non identifié. La prochaine étape consistera donc en la recherche et la mise au point de marqueurs moléculaires fonctionnels notamment les enzymes impliquées dans la dégradation des bois. En effet, la dégradation du bois implique différents mécanismes enzymatiques selon les types de pourritures (lignine peroxydases, Mn-peroxydases, cellulases, etc.) et la diversité des organismes et des systèmes enzymatiques mis en jeu lors de la dégradation fongique du bois devraient permettre de cibler des portions génomiques adaptées au diagnostic précoce *in situ* d'une présence fongique. L'obtention de marqueurs spécifiques pour ces champignons permettra de diagnostiquer la présence d'un champignon dans les bois avant même l'apparition d'altération préjudiciable à la mise en œuvre du bois.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de normes établies pour les contaminants fongiques dans un bois. Nos travaux pourront être utilisés comme base pour l'établissement de telles normes qui devraient permettre de définir la nature et les quantités maximales de champignons tolérables dans un bois pour ne pas aboutir rapidement à une dégradation de ses propriétés physiques et



mécaniques de même qu'à la propagation involontaire d'espèces particulièrement virulentes lors des transports à longue distance.

Les Basidiomycètes sont caractérisés selon des critères anatomo-morphologiques. Ainsi, au fil des ans, l'exploration de la diversité de ces champignons, notamment tropicaux a permis la découverte d'espèces et de genres nouveaux. Depuis quelques années, le développement des outils moléculaires comme le séquençage a permis de revoir l'importance taxinomique de certains caractères permettant aussi de faire évoluer la classification des Basidiomycètes à presque tous les niveaux. Dans ce contexte, la caractérisation moléculaire de champignons tropicaux lignivores que nous envisageons dans le cadre d'un projet du Bureau des Ressources Génétiques générera des données permettant de compléter les bases de données où actuellement, les séquences des taxons qui dégradent le bois sont sous représentées. Ce projet permettra également d'explorer la diversité des gènes impliqués dans la dégradation du bois de même que leur évolution et leur préservation *in situ* et *ex situ*.

# **ANNEXES**

## Annexe 1

Quelques exemples d'arbres attaqués par des champignons lignivores Basidiomycètes.

- Espèces fongiques
- Zone géographique :
  - Eur. : Europe
  - Amé. : Amérique
  - Afr. : Afrique
  - Rus. : Russie
  - Dk. : Danemark
  - Nd. : Nord
  - Cen. : Centre
  - Trop. : (zones) tropicales
- Type de végétal attaqué :
  - Fl. : feuillus
  - Cn. : conifères
  - Or. : ornementaux
- Exemples d'arbres attaqués

Espèce fongique	zone géographique	type végétal attaqué	exemples arbres attaqués
<i>Abortiporus biennis</i>	Eur	fl	<i>Acer sp.</i> ; <i>Platanus sp.</i> ; <i>Tilia sp.</i> <i>Aesculus hyppocastunum</i> ; <i>Ulmus sp</i>
<i>Antrodia cf. vaillantii</i>	Eur	cn	
<i>Antrodia serialis</i>	Eur	cn	
<i>Bjerkandera adusta</i>	Eur	fl + or	<i>Fagus</i> ; <i>Populus nigra</i>
<i>Cerrena unicolor</i>	Eur	fl + or	<i>Quercus</i> ; <i>Robinia</i> ; <i>Acer sp.</i>
<i>Climacocystis borealis</i>	Eur	cn	<i>Picea abies</i>
<i>Coniophora puteana</i>	Eur	cn	<i>Pinus</i>
<i>Coriolus zonatus</i>	Madagascar	fl	
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Eur, Asie	fl	<i>Betula</i> ; <i>Fagus</i> ; <i>Salix</i> ; <i>Aesculus hippocastunum</i>
<i>Donkiopora expansa</i>	Eur, Nd-Amé	fl et cn	
<i>Favolus mori</i>		fl	
<i>Flavodon flavus</i>	Centreafr		
<i>Fistulina hepatica</i>	Eur, Nd-Amé	fl	<i>Castanea</i> ; <i>Quercus</i>
<i>Fomes fomentarius</i>	Eur, Asie Nd-Afr, Nd-Amé	fl + or	<i>Alnus</i> ; <i>Betula</i> ; <i>Tilia sp.</i> ; <i>Fagus</i>
<i>Fomitopsis officinalis</i>	Nd-Afr ; Asie ; Canada Russie	cn	<i>Larix decidua</i>

<i>Fomitopsis pinicola</i>	Eur,Nd-Afr, Nd-Amé	cn	<i>Abies alba</i> ; <i>Pinus</i> ; <i>Picea abies</i>
<i>Ganoderma adspersum</i>		fl + or	
<i>Ganoderma lucidum</i>	Eur	fl or.	<i>Populus nigra</i> ; <i>Acer</i> ; <i>Aesculus hippocastunum</i> ; <i>Tilia sp.</i> ; <i>Aesculus hippocastunum</i> ;
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Eur,Nd-Afr,	fl	<i>Acer sp.</i> ; <i>Quercus rubra</i> ; <i>Ulmus sp.</i>
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	Europe		
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	Eur (sud), Nd-Afr, Asie	cn	
<i>Heterobasidion annosum</i>	Eur, Nd-Amé	cn	<i>Larix decidua</i> ; <i>Abies alba</i>
<i>Hexagonia nitida</i>	Turquie, Chypre Maroc,Algérie	fl	
<i>hexagonia hydnoïdes</i>	Guyane française		
<i>Inonotus radiatus</i>	Eur, Nd Asie,Nd-Amé	fl	
<i>Irpex flavus</i>	Cen-Afr		
<i>Meripilus giganteus</i>		fl	<i>Fagus</i>
<i>Oligoporus caesius</i>	Eur	cn et fl	
<i>Oligoporus stipticus</i>	Eur	cn (+ fl)	
<i>Oxyporus latemarginatus</i>	Eur	fl	
<i>Perenniporia fraxinea</i>	Eur, Est U.S,	fl or.	
<i>Perenniporia subacida</i>	Eur, Asie,Nd-Amé	cn	<i>Pinus</i>
<i>Phellinus ferreus</i>	Eur	fl	
<i>Phellinus pini</i>	Eur	cn	<i>Pinus</i>
<i>Phellinus pomaceus</i>	Nd Eur	fl or.	<i>Prunus nigra</i>
<i>Phellinus torulosus</i>	Eur, Rus.,Arizona,	fl	<i>Populus</i>
<i>Polyporus melanopus</i>	Nd Eur	fl (+cn)	
<i>Poria placenta</i>		cn	
<i>Rigidoporus ulmarius</i>	Eur	fl	<i>Ulmus sp.</i> ; <i>Fraxinus sp.</i>
<i>Trametes odorata</i>	Eur, Maroc,Asie,	fl	
<i>Trametes pubescens</i>	Eur	fl	
<i>Trametes versicolor</i>	Eur	fl + or	<i>Acer sp.</i> ; <i>Celtis australis</i> ; <i>Platanus sp.</i> ;

## Annexe 2

### Réactifs utilisés dans cette étude

#### □ *Acétate de sodium 3 M pH=5,2*

Acétate de sodium	102 g
Eau déminéralisée	200 mL

Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique glaciale puis ajuster le volume à 250 mL et autoclaver.

#### □ *Amorces*

- Dilution de 300 pmol/μL à 20 pmol/μL:

Amorces à 300 pmol/μL	10 μL
Eau stérile	140 μL

- Dilution de 20 pmol/μL à 3,2 pmol/μL :

Amorce à 20 pmol/μL	8 μL
Eau stérile	42 μL

#### □ *BET*

BET concentré (0,625 mg/mL)	312 μL
Eau stérile	4,688 mL

#### □ *dNTP 2,5 mM*

dATP ( 100 mM )	10 μL
dCTP ( 100 mM )	10 μL
dGTP ( 100 mM )	10 μL

Suite Annexe 4

dTTP ( 100 mM )	10 μL
Eau stérile	360 μL

#### □ *EDTA 0,5 M à pH=8 (solution mère)*

EDTA	93,075 g
Eau déminéralisée	300 mL

Ajuster avec l'eau jusqu'à 500 mL. Le pH est ajusté à 8 avec de la soude NaOH puis la solution est filtrée (0,2 μm ) et stérilisée 20 min à 120°C.



□ **TAE 50X (solution mère)**

Tris Base	242 g
Acide acétique glacial	57,1 mL
EDTA ( 0,5 M, pH=8 )	100 mL

Ajuster à 1 litre avec de l'eau déminéralisée en chauffant pour dissoudre. Puis du TAE 1X : 20 mL de TAE 50X / litre d'eau déminéralisée.

*Suite Annexe 4*

□ **Gel d'agarose**

Type et nature de l'agarose utilisé, étapes concernées et conditions de migration des différents gels de contrôle réalisés.

Types et différentes concentrations d'agarose	Etapes concernées	Conditions de migration
Agarose 0,8%	Purification de l'ADN, PCR de l'ITS	120V, 30 min.
Agarose 2%	Evaluation npb de l'ITS	70V, 4 h
Agarose 0,8% + Nusieve 2,2%	Digestions des ITS	70V, 4 h

npb : nombre de paires de bases

Faire chauffer l'agar dans le tampon au four micro-onde pour le dissoudre, puis ajouter une goutte de BET (3,75 µL) pour le petit gel ou 2 gouttes pour le moyen gel.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Adair S., Kim S.H. et Breuil C. 2002. A molecular approach for early monitoring of decay Basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**:117-122.
- Adams G.A. et Knopp B.R. 1996. *Athelia arachidicola*, the sexual state of *Rhizoctonia carotae*, a pathogen of carrot in cold storage. *Mycologia* **88**:459-472.
- Ainsworth J.C., Kirk P.M., Bisby G.R., Cannon P.F., David J.C. et Stalpers J.A. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi. CAB International.
- Akhtar M., Attridge M., Myers G.C., Blanchette R.A. et Kirk T.K. 1992. Biochemical pulping of loblolly pine with different strains of the white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *TAPPI J.* **75**:105-109.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.
- Ambert K. 1996. Étude ultrastructurale de la dégradation des fibres lignocellulosiques par le champignon filamenteux *Phlebia radiata*. Thèse de doctorat de l'Université J. Fourier, Grenoble I, 211 p.
- Andary C., Courtecuisse R. et Bourrier M.J. 1991. Atlas microphotographique pour l'expertise et le contrôle des champignons comestibles et leurs falsifications. Montpellier, EUROMEDIA, 547 p.
- Ander P. 1994. The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation- a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**:297-312.
- Asada Y., Watanabe A., Ohtsu Y. et Kuwahara M. 1995. Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**:1339-1341.
- Bailey P.J., Walter A.H. et Elephick J.J. 1968. Some aspects of cellulose degradation in lignified cell walls. Dans : Biodeterioration of Materials, Amsterdam, Elsevier, 546-557.
- Barroso G. et Labarère J. 1997. Genetic evidence for non-random sorting of mitochondria in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4686-4691.
- Berbee M.L. et Taylor J.W. 1993. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.* **71**:1114-1127.
- Berres M.E., Szabo L.J. et Mc Laughlin D.J. 1995. Phylogenetic relationships in Auriculariaceae Basidiomycetes based on 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**:821-840.
- Blanchette R.A., Nilsson T.A., Daniel G. et Abad A. 1990. Biological degradation of wood. Dans : Archeological Wood Properties, Chemistry and Preservation, (eds.) Rowell R.M. et Barbour R.J. *Am. Chem. Soc. Washington*, **225**:141-174.

- Boidin J. 1986. Intercompatibility and the species concept in the saprobic Basidiomycotina. *Mycotaxon* **26**:319-336.
- Boidin J. et Lanquetin P. 1997. Répertoire des données utiles pour effectuer les tests d'intercompatibilité chez les Basidiomycètes. VII. Aphyllophorales non porées. *Cryptogam. Mycol.* **18**:9-18.
- Boidin J., Mugnier J. et Canales R. 1998. "Taxonomie moléculaire des Aphyllophorales". *Mycotaxon* **66**:445-491.
- Bon M. 1988. Champignons de France et d'Europe occidentale. Paris, L'édition française, les éditions Arthaud, 368 p.
- Bourbonnais R. et Paice M.G. 1990. Oxydation of non-phenolic substrats. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **267**:99-102.
- Bowman B.H., Taylor J.W., Brownlee A.G., Lee J., Lu S.D. et White T.J. 1992. Molecular evolution on the fungi: relationship of the Basidiomycetes; Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **9**:285-296.
- Brasier C.M. 1992. A champion thallus. *Nature* **356**: 382-383.
- Bresinsky A. 1996. Abstammung, Phylogenie und Verwandtschaft im Pilzreich. *Zeitschr. Myk.* **62**:147-168.
- Breuil C. 1987. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection staining and biological control agents. *Can. For. Serv. Proj. Rep.* **39**:43-46.
- Breuil C., Rossignol L. et Saddler J.N. 1990. Refinement of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting sapstain fungi in wood. *Biotechnol. Tech.* **4**:263-268.
- Bruns T.D., Palmer J.D., Shumard D.S., Grossman L.I. et Hudspeth M.E.S. 1988. Mitochondrial DNA of *Suillus*: three-fold change in molecules that share a common gene order. *Current Genetics* **13**:49-56.
- Bruns T.D., Fogel R., White T.J. et Palmer J.D. 1989. Accelerated evolution of a false truffle from a mushroom ancestor. *Nature*. **339**:140-142.
- Bruns T., White T.J. et Taylor J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-564.
- Bruns T. D. et Szaro T. M. 1992. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 836-855.
- Bull J. J., Huelsenbeck, J. P., Cunningham, C. W., Swofford, D. L. et Waddell, P. J. 1993. Partitioning and combining data in Phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**:384-397.
- Burnett J. 2003. Fungal populations and species. Oxford University Press, Oxford, 348 p.

- Cahill D.M. et Hardham A.R. 1994. A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Phytopathol.* **84**:1284-1292.
- Carpita N.C. et Gibeault D.M. 1993. Structural models of the primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**:1-30.
- Chanzy H., Kennedy J.F., Phillips G.O. et Williams P.A. 1990. Aspects of cellulose structure. Dans : Cellulose sources and exploitation, (ed.) Horwood E. New York, 3-12.
- Clark, J. B., Maddison, W. P., and Kidwell, M. G. 1994. Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of P transposable elements. *Molecular Biology and Evolution* **11**: 40-50.
- Clausen C.A., Green F. et Highley T.L. 1990. Early detection of brown-rot decay in southern yellow pine using immunodiagnostic procedures. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/2356.
- Clausen C.A., Green F. et Highley T.L. 1993. Characterization of monoclonal antibodies to wood-derived  $\beta$ -1,4-xylanase of *Posita Placenta* and their application to detection of incipient decay. *Wood Sci. Technol.* **27**:219-228.
- Clausen C.A. ET Ferge L. 1995. Dimensional lumber model demonstrates the sensitivity of the particle capture immunoassay in early detection of brown-rot fungi. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc.N°. IRG/WP/95-20058.
- Clausen C.A. 1996. Detection of brown-rot fungal antigens in southern pine. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/20090.
- Clausen C.A., Green F. 1997. Antibody-mediated immunochemistry and immuno-assay in plant related diseases. Dans : Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, (ed.) Dashek W. CRC Press, New York.
- Courtecuisse R. et Duhem B. 1994. Guide des champignons de France et d'Europe. Paris : Delachaux et Niestlé S.A. Lausanne (Switzerland) et Paris.
- Cowling E.B. 1961. Comparative Biochemistry of the decay of Sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. *U.S.D.A. F.S. Tech. Bull.* n° 1258, 79p.
- Cracraft C. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Ornithology* **1**:159-187.
- Cronn R. C., Zhao X., Paterson A. H. et Wendel J. F. 1996. Polymorphism and concerted evolution in a multigene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of molecular Evolution* **42**, 685-705.
- Cullings K., Szaro T.M. et Bruns T.D. 1996. Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal parasites. *Nature* **379**:63-66.
- Cullings K.W. et Vogler D.R. 1998. A 5,8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: application to ecology and evolution. *Mol. Ecol.* **7**:919-923.



- Daniel G., Volc J. et Kubatova E. 1994. Pyranose oxidase, a major source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2524-2532.
- Darlu, P. et Tassy P. 1993. Reconstitution phylogénétique. *Masson*.
- Debaud J.C., Marmeisse R. et Gay G. 1999. Intraspecific genetic variation and populations of ectomycorrhizal fungi. Dans : Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function, Springer-Verlag, Berlin, 75-110.
- Delmer D.P. et Amor Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* **7**:987-1000.
- Dennis R.L. 1970. A Middle Pennsylvanian Basidiomycete mycelium with clamp connections. *Mycologia* **62**:578-584.
- Deon G. 1986. Manuel de préservation des bois en climat tropical. Deuxième édition. CTFT, 116p.
- Dey S., Maiti T.K. et Bhattacharyya B.C. 1991. Lignin peroxidase production by a brown-rot fungus *Polyporus ostreiformis*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**:402-404.
- D'Souza T.M., Boominathan K. et Reddy C.A. 1996. Isolation of laccases gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3739-3744.
- Dirol D. 1976. Étude *in vitro* de la colonisation et de la dégradation structurale du bois de Hêtre par *Coriolus versicolor* (L.) Q. *Rev. Mycol.* **40**:295-317.
- Dirol D. 1977. Dégradation du bois de pin sylvestre par la mérule. Centre Technique du Bois, 55 p.
- Donaldson G.C., Ball L.A., Axelrood P.E. et Glass N.L. 1995. Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1331-1340.
- Doyle J.J. 1992. Gene trees and species trees: Molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst.Bot.* **17**:144-163.
- Dunlap J.L. 1981. Testing poles by using acoustic pulse method. *Wood Science Technology*, **15**:301-310.
- Ducousso M., Abourouh M., Honrubia M. et Mousain D. 1998. Characterization of *Pisolithus* spp. using PCR/RFLP of rDNA Internal Transcribed Spacer. *ICOM2, Uppsala, Sweden*, 54 (P).
- Ducousso M., Bâ A.M. et Thoen D. 2003. Les champignons ectomycorhiziens des forêts naturelles et des plantations d'Afrique de l'Ouest : une source de champignons comestibles. *Bois For. Trop.* **275**:51-63.

- Eaton R.A. et Hale M.D.C. 1993. Wood decay, pests and protection. Chapman and Hall, London, 546 p.
- Egger K.N., Danielson R.M. et Fortin J.A. 1991. Taxonomy and population structure of E-strain mycorrhizal fungi inferred from ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms. *Mycol. Res.* **95**:866-872.
- Egger K.N. et Fortin J.A. 1992. Identification of taxa of E-strain mycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. *Can. J. Bot.* **68**:1482-1488.
- El Karkouri K. 1996. Caractérisation isoenzymatique d'Homobasidiomycètes ectomycorhiziens en culture *in vitro* ou en association symbiotique avec des pins. Thèse Doctorale, Université Montpellier II, France.
- Enoki A., Tanaka H. et Fuse G. 1988. Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose and wood components by white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* **42**:85-93.
- Eriksson K.E., Blanchette R.A. et Ander P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Series in Wood Science, 407 p.
- Erland S., Henrion B., Martin F., Glover L.A. et Alexander I.J. 1994. Identification of the ectomycorrhizal Basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. *New Phytol.* **126**:525-532.
- Eslyn W.E. 1979. Utility pole decay. Part III. Detection in pine by color indicators. *Wood Science Technology*, **13**:117-126.
- Faison B.D. et Kirk T.K. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:299-304.
- Fengel D. et Wegener G. 1984. Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter ed., Berlin, New York.
- Felsenstein J. 1995. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Felsenstein J. 1999. PHYLIP- Phylogeny Inference Package (Version 3.2).
- Ferraz A., Rodriguez J., Freer J. et Baeza J. 2001. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:31-34.
- Findlay G.W. et Levy J.F. 1969. Scanning electron microscopy as an aid to the study of wood anatomy and decay. *J. Inst. Wood Sci.* **4**:57-63.
- Fougerousse M. 1979. Préservation des menuiseries contre la pourriture. *Bois For. Trop.* **183**:49-66.

Freudenberg K. et Neish A.C. 1968. Constitution and biosynthesis of lignin. Dans : Molecular biology, biochemistry and biophysics, (eds.) Kleinzeller A., Springer G.F. et Wittman H.G., Springer-verlag, New York, 1-129.

Fries N. et Neumann W. 1990. Sexual incompatibility in *Suillus luteus* and *S. granulatus*. *Mycol. Res.* **94**:64-70.

Fry S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**:165-186.

Fukushima Y. et Kirk T.K. 1995. Laccase component of the *Ceriosporiopsis subvermispora* lignin-degradating system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:872-876.

Gardes M., Muller G.M., Fortin J.A. et Kropp B.R. 1991. Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycol. Res.* **95**:206-216.

Gardes M. et Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113-118.

Gilbertson R.L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* **72**:1-49.

Glass N.L. et Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1323-1330.

Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M. et Gold M.H. 1983. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **114**:1077-1083.

Göller K. et Rudolph D. 2003. The need for unequivocally defined reference fungi – Genomic variation in two strains named as *Coniophora puteana* BAM Ebw.15. *Holzforschung* **57**:456-458.

Goodell B.S. et Jellison J. 1986. Detection of a brown-rot fungus using serological Assays. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/1305.

Goodell B., Liu J., Jellison J., Lu J., Paszczynski A. et Fekete F. 1995. Chelation activity and hydroxyl radical production mediated by low molecular weight phenolate compounds isolated from *Gloeophyllum trabeum*. 6<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the pulp and Paper Industry. Vienna, Austria 11-15 June 1995. WIFI Österreich. P-K Pp.89.

Greaves H. et Levy J.F. 1969. Comparative degradation of the sapwood of scots pine, beech and birch by *Lenzites trabeum*, *Polysticus versicolor*, *Chaetomium globosum*. *J. Int. Wood Sci.* **15**:55-63.

Grossman L.I. et Hudspeth M.E.S. 1988. Fungal mitochondrial genomes. Dans : Gene manipulation in fungi, (eds.) Bennett J.W. et Lasure L.L. Academic Press, Orlando, Floride, 65-103.

Gryta H., Debaud J.C., Effosse A., Gay G. et Marmeisse R. 1997. Fine scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Mol. Ecol.* **6**:353-364.

Guerin-Laguette A. 1998. Les lactaires à lait rouge : mycorhization contrôlée des pins et caractérisation moléculaire. Application à l'étude de la compétence écologique et de la compétitivité d'isolats de *Lactarius deliciosus*. Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, France, 116 p.

Guerin-Laguette A., Conventi S., Ruiz G., Plassard C. et Mousain D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* **13**:17-25.

Guillén F., Martínez A.T. et Martínez M.J. 1990. Production of aryl-alcohol oxydase from lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:465-469.

Guillén F., Martínez A.T. et Martínez M.J. 1992. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxydase from the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **209**:603-611.

Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. et Evans C.S. 1994. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii*. Involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxydase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:465-470.

Hallenberg N., Larsson E. et Mahlapuu M. 1996. Phylogenetic studies in *Peniophora*. *Mycol. Res.* **100**:179-187.

Hammel K.E. et Moen M.A. 1991. Depolymerization of a synthetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase. *Enzyme Microbiol. Technol.* **13**:15-18.

Hansen E.M., Stenlid J. et Johansson M. 1993. Genetic control of somatic incompatibility in the root-rotting Basidiomycete *Heterobasidion annosum*. *Mycol. Res.* **97**:1229-1233

Harrington T.C. et Wingfield B.D. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* **87**:280-288.

Harrington T.C. et McNew D.L. 1998. Partial interfertility among the *Ceratocystis* species on conifers. *Fungal Gene Biol.* **12**:45-49.

Harrington T.C. et Potter D. 1997. Phylogenetic relationships within *Sarcoscipha* based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia*. **89**: 258-267.

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. et Pegler D.N. 1995. Ainsworth and Bisby's *Dictionary of the Fungi*, 8<sup>th</sup> Ed.. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 616 p.

Henikoff S. et Henikoff J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10915-10919.

- Henrion B., Le Tacon F. et Martin F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* **122**:289-298.
- Hibbett D. S. et Vilgalys R. 1993. Phylogenetic relationships of *Lentinus* (Basidiomycotina) inferred from molecular and morphological characters. *Systematic Botany* **18**: 409-433.
- Hibbett D.S. et Donoghue M.J. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the *Polyporaceae* through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* **73**:853-861.
- Hibbett D.S. et Donoghue M.J. 1996. Implications of phylogenetic studies for conservation of genetic diversity in Shiitake mushrooms. *Conservation Biology* **10**:1321-1327.
- Hibbett D.S., Grimaldi D. et Donoghue M.J. 1997. Fossil mushrooms from Miocene and Cretaceous ambers and the evolution of Homobasidiomycetes. *Am. J. Bot.* **84**:981-991.
- Hibbett, D.S., Gilbert L.B., and Donoghue M.J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* **407**: 506-508.
- Hibbett D.S. et Donoghue M.J. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in Homobasidiomycetes. *Syst. Biol.* **50**:215-242.
- Higgins Sharp 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Cabios* **5**:151-153.
- Higgins D.G., Thompson J.D. et Gibson T.J. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* **266**:383-402.
- Highley T. 1973. Effects of alkaline treatment on decay resistance of wood. *Forest Prod. J.* **23**:47-51.
- Highley T. 1987. Biochemical aspects of white-rot and brown-rot decay. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/1319.
- Highley T., Kirk T. et Ibach R. 1989. Effect of brown-rot fungi on cellulose. *Biodeter. Res.* **2**, 511-525.
- Highley T.L., Micales J.A., Illman B.L., Green F., Croan S.C. et Clausen C.A. 1994. Research on Biodeterioration of Wood – 1987-1992. *Research Paper FLP-RP-530*. US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI, 7pp.
- Higuchi T. 1989. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In: *Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation*. N.G. Lewis et Paice M.G. ed. ACS Symposium 399:482-502.
- Hillis W.E. 1972. Formation and properties of some wood extractive. *Phytochem.* **11**:1207-1218.



- Hillis D.M. et Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**:411-453.
- Hillis D. M. 1996. Inferring complex phylogenies. *Nature* **383**: 130-131.
- Huelsenbeck J.P. 1995. Performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.***44**:17-48.
- Illingworth C.A., Andrews J.H., Bibeau C. et Sogin M.L. 1991. Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans* and *Colletotrichum gloeosporoides* inferred from sequence comparisons of small-subunit ribosomal RNAs. *Experim. Mycol.* **15**:65-75.
- Jacquot M.D. 1974. La protection des bois abattus. Cahier n° 66 du Centre Technique du bois – Série II : Exploitations forestières et Scieries.
- Jacobson K.M. et Miller O.K. 1993. Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* :90 :9159-9163.
- Jasalavich C., Ostrofsky A. et Jellison J. 1998. Detection of wood decay Fungi in wood using a PCR-based analysis. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/10279, 12 p.
- Jasalavich C.A., Ostrofsky A. et Jellison J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified gene encoding rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4725-4734.
- Johnson L. A. et Soltis D. E. 1998. Assessing Congruence: Empirical examples from molecular data. In Soltis D., Soltis P. et Doyle J. Eds: Molecular Systematics of Plants. 2nd Ed. *Chapman and Hall, New York*.
- Johnson L. A. et Soltis D. E. 1998. Assessing Congruence: Empirical examples from molecular data. In Soltis D., Soltis P. et Doyle J. Eds: Molecular Systematics of Plants. 2nd Ed. *Chapman and Hall, New York*.
- Joly P., Lanier L., Bondoux P. et Bellemère A. 1978. Les champignons supérieurs (généralités). Dans : Mycologie et Pathologie forestières, I. Mycologie forestière, Paris : Masson, 31-70.
- Joseleau J.P., Comtat J. et Ruel K. 1992a. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. Dans : Xylans and xylanases, Progress in biotechnology Vol 7, (eds) Visser J., Beldman G., Kusters-van someren M.A. et Voragen A.G.J. Elsevier, 1-16.
- Joseleau J.P. et Ruel K. 1992b. Ultrastructural examination of lignin and polysaccharide degradation in wood by white-rot fungi. Dans : Biotechnology in pulp and paper industry, (eds.) Kuwahara M. et Shimada M. Uni Publishers Co Ltd., Kyoto, Japan, part II, 195-202.
- Jülich W. 1981. "Higher taxa of Basidiomycetes". J.Cramer, Vaduz, Liechtenstein. *Bib.Mycol.* **85**: 485pp.
- Kasuga T., Woods C., Woodward S. et Mitchelson K. 1993. *Heterobasidion annosum* 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence. *Curr. Genet.* **24**: 433-436.

- Kenrick P. et Crane P.R. 1997. The origin and early diversification of land plants: a cladistic study. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 441 p.
- Kerr A.I. et Goring D.A.I. 1975. The ultrastructural arrangement of the wood cell wall. *Cellulose Chem. Technol.* **9**:563-573.
- Kersten P.J., Tien M., Kalyanaraman B. et Kirk T.K. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* **260**:2609-2612.
- Kersten P.J. et Kirk T.K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **169**:2195-2201.
- Kim, S.H., Uzunovic, A., and Breuil C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma picea* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:287-290
- Kim Y.S. et Singh A.P. 2000. Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review. *IAWA Journal* **21**:135-155.
- Kirk T.K. et Adler E. 1970. Methoxyl deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. *Acta Chem. Scand.* **24**: 3379-3390.
- Kirk T.K. 1973. The chemistry and biochemistry of decay. Dans : Wood deterioration and its prevention by preservative treatments, (ed.) Nicholas D.D., Syracuse University Press, 149-181.
- Kirk T.K. et Farrell R.L. 1987. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:465-505.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. et Stalpers J.A. 2001. Ainsworth et Bisby's dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford, UK.
- Kleist G. et Bauch J. 2001. Cellular UV microspectrophotometric investigation of Sapelli heartwood (*Entandrophragma cylindricum* Sprague) from natural provenances in Africa. *Holzforschung* **55**:117-122.
- Kleman-Leyer K.M., Kirk T.K. 1994 : Three native cellulose-depolymerizing endoglucanases from solid substrate cultures of the brown-rot fungus *Meruliporia (Serpula) incrassata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2839-2845
- Koenings J.W. 1974. Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood fiber.* **6**:66-80.
- Korhonen K. 1978. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Kartstenia* **18**:31-42
- Koski LB., Golding GB. (2001). The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J. Mol Evol.*, Vol.52, 6:540-542.

- Kreutzinger N., Podeu R., Gruber F., Göbl F. et Kubicek C.P. 1996. Identification of some ectomycorrhizal Basidiomycetes by PCR amplification of their GPD (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3422-3438.
- Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A. et Gold M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant oxydases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **169**:247-250.
- Labat G. et Meunier B. 1990. Etudes de la dégradation enzymatique de la lignine : évolutions récentes. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **127**:553-564.
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L. et Pace N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6955-6959.
- Lange B.M., Lapierre C. et Sandermann Jr. H. 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin. *Plant Physiol.* **108**:1277-1287.
- Lawrence J.G. et Roth J.R. 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetic* **143**:1843-60.
- Leake J.R. et Read D.J. 1997. Mycorrhizal fungi in terrestrial habitats. In: (Wicklow D. et Söderström B. Eds) *The mycota IV*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 281-301.
- Lecellier G. et Silar P. 1994. Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* **25**:122-123.
- Lee S.B. et Taylor J.W. 1992. Phylogeny of five fungus-like *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**:636-653.
- Lepage B.A., Currah R.S., Stockey R.A. et Rothwell G.W. 1997. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *Am. J. Bot.* **84**:410-412.
- Lewis N. et Yamamoto E. 1990. Lignin, occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**:455-496.
- Liese W. 1970. Ultrastructural aspects of woody tissue desintegration. *Ann. Rev. Phytopath.* **8**:231-258.
- Liese W. 1975. Biological transformation of wood by Microorganisms. Springer-Verlag, 201 p.
- Liu Y.J., Rogers S.O. et Ammirati J.F. 1997. Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Can. J. Bot.* **75**:519-532.
- Lockhart P. J., Steel M. A., Hendy M. D. et Penny D. 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **11**: 605-612.

- Madison W. P. et Madison D. R. 1992. MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution, version 3.04. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*
- Magel E.A., Monties B., Drouet A., Jay-Allemand C. et Ziegler H. 1995. Heartwood formation: Biosynthesis of heartwood extractives and secondary lignification. Dans : Proceeding Eurosilva – Contribution to forest tree physiology, November, 7-20 1994, Dourdan, France, (eds.) Sandermann Jr H. et Bonnet-Masimbert M. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 35-56.
- Martin F., Diez J., Dell B. et Delaruelle C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* **153**:345-357.
- Martínez A.T., Camarero S., Guillén F., Gutiérrez A., Muñoz C., Varela E., Martínez M.J., Barrasa J.M., Ruel K. et Pelayo J.M. 1994. Progress in biopulping of non-woody materials : Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with lignolytic fungi from the genus *Pleurotus* . *FEMS Microbiol. Rev.* **13**:265-274.
- Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement of the saga of the species problem. Dans : Species: the units of biodiversity, (eds.) Claridge M.F., Dawson H.A. et Wilson M.R. Chapman and Hall, New York, 381-424.
- Mayr E. 1975. Population, species and evolution. An abridgment of animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 453 p.
- Mayr E. 1982. Speciation and macroevolution. *Evol.* **36**:1119-32.
- Meier H. 1964. General chemistry of cell walls and distribution of the chemical constituents across the walls. Dans : The formation of wood in forest trees, (ed.) Zimmermann M.H. Academic Press, New York, London, 137-151.
- Micales J., Bonde M.R. et Peterson G.L. 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon.* **27**:405-449
- Micales J. et Highley T. 1988. Some physiological characteristics of a nondegradative stain of *Postia (Poria) placenta*. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/1341
- Miyamoto M. M. et Fitch W. M. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* **44**: 64-76.
- Moncalvo J.M., Rehner S.A. et Vilgalys R. 1993. Systematics of *Lyophyllum* section *Difformia* based on evidence from cultures studies and ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **85**:788-794.
- Moncalvo J.M., Wang H.H. et Hseu R.S. 1995a Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25 S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**:223-238.

- Moncalvo J.M., Wang H.H. et Hseu R.S. 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res.* **99**:1489-1499.
- Moncalvo J.M., Lutzoni F.M., Rehner S.A., Johnson J. et Vilgalys R. 2000. Phylogenetic relationships of agaricales fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst.Biol.*, **49**:278-305.
- Montembault S. 1995. Étude par PCR-RFLP de la diversité de l'ADN ribosomal nucléaire d'isolats de quatre espèces ectomycorhiziennes associées aux pins (*Lactarius sanguifluus*, *L. semi-sanguifluus*, *L. deliciosus* et *L. salmonicolor*). Diplôme d'Études Approfondies, Université de Montpellier II, France, 26 p.
- Moore-Landecker E. 1996. Fundamentals of the fungi (4th Ed.). Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 574 p.
- Moreth U. et Schmidt O. 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* **54**:1-8.
- Morris P.I. et Dickenson D.J. 1984. The effect of moisture content on the electrical resistance of timber as detected by a pulsed current metter resistance meter (Shigometer). Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc.N°. IRG/WP/2212.
- Mswaka A.Y. et Magan N. 1998. Wood degradation, cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting Basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. *Mycol. Res.* **102**:1399-1404.
- Mullis K.B. et Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- Munoz C., Guillén F., Martínez A.T. et Martínez M.J. 1997. Induction and characterization of laccase in the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* **34**:1-5.
- Nakasone K.K. et Sytsma K.J. 1993. Biosystematic studies on *Phlebia acerina*, *P. rufa* and *P. radiata* in North America. *Mycologia* **85**:996-1016.
- Nakasone K.K. 1996. Morphological and molecular studies on *Auriculariopsis albomellea* and *Phlebia radiata* and a reassessment of *A. ampla*. *Mycologia* **88**:223-238.
- Nault J. 1988. Radial distribution of thujaplicins in old growth and second growth western red cedar (*Thuja plicata* donn.). *Wood Sci. Technol.* **22**:73-80.
- Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Salopa P. et Raunio V. 1988. Lignolytic enzymes from the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* **254**:877-884.
- Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T. et Hatakka A. 1990. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *J. Biotechnol.* **13**:211-221.



- Nilsson T. 1973. Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Studia Forestalia Suecia*, 104 p.
- Nimz H.H. 1974. Beech lignin. Proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **13**:313-320.
- Nixon C. et Crepet W.L. 1993. A sympetalous caryophylloid flower from the Late Cretaceous of New Jersey. *Am. J. Bot.* **80**:92.
- Nobles M.K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can.J.Bot.* **44**:1097-2065.
- Ochman H., Lawrence J.G. et Groisman E.A. 2002. Lateral gene transfert and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304.
- Oh S., Kamden P., Keathley D. et Han. K.H. 2003. Detection and species identification of wood-decaying fungi by hybridization of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes with PCR-amplified fungal ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Holzforschung* **57**:346-652.
- Ohno S. 1970. Evolution by Gene Duplication. *Springer Verlag, New York*.
- Ojten L., Blanchette R.A., Effland M. et Leatham G. 1987. Assessment of 30 white rot Basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung* **41**:343-349.
- Ohsawa M., Kuroda Y., Katsuya K et Takei H. 1992. Ability of fungi inhabiting larch trunks with buttrot to utilize wood components *in vitro*. *J. Jap. For. Soc.* **74**:300-307.
- Ouis D. 2000. Detection of decay in logs through measuring the dampening of bending vibrations by means of a room acoustical technique. *Wood Science Technology*, **34**:221-236.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- Palfreyman J.W., Glancy H., Button D., Bruce A., Vigrow A., Score A. et King B. 1988. Use of immunoblotting for the analysis of wood decay Basidiomycetes. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/2307, 8 p.
- Palfreyman J.W., Vigrow A., Button D., Hegarty B., et King B. 1991. The use of molecular methods to identify wood decay organisms. 1. The electrophoretic analysis of *Serpula lacrymans*. *Wood Protection* **1**:15-22.
- Pelaez F., Martinez M.J. et Martínez A.T. 1995. Screening of 68 species of Basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* **99**:37-42.
- Perez J. et Jeffries T.W. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2402-2409.
- PHYLIP. Version3.5c. 1986-1995. Felsenstein, J. University of Washington.

- Poe S. et Swoffort D.L. 1999. Taxon sampling revisited. *Science* **398** : 299-300.
- Preston R.D., Nicolai E., Reed R. et Millard A. 1948. Electronic study of cellulose in the wall of *Valonia ventricosa* *Nature* **162**:665-667.
- Ragan MA.(2001), On surrogate methods for detecting lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jul 24;201(2):187-91.
- Redecker D., Morton J.B. et Bruns T.D. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol.Phyl.Evol.* **14**:276-284.
- Redecker D., Mszaro T., Bowman R.J. et Bruns T.D. 2001. Small genets of *Lactarius Xanthogalactus*, *Russula cremicolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Mol. Ecol.* **10**:1025-1034.
- Rees D.A. 1982. Polysaccharide conformation in solutions and gels. Recent results on pectins. *Carbohydr. Polymers* **2**:254-263.
- Risler J.L., Louis A., Mohsenizadeh S., Brezellec P. et Diaz-Lazcoz Y. 1993. Les comparaisons massives de séquences. Laboratoire Génome et Informatique. Document : 23pp.
- Ritschkoff A.C., Buchert J. et Viikari L. 1994. Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *J. Biotechnol.* **32**:67-74.
- Robert D. et Vian B. 1994. Eléments de biologie cellulaire. Doin éditeurs-Paris, 461 p.
- Rocha E.P. et Danchin A. 2002. Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet* **18**:291-294.
- Rogers S.O., Rehner S., Bledsoe C., Mueller G.J. et Ammirati J.F. 1989. Extraction of DNA from basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations. *Can. J. Bot.* **67**:1235-1243.
- Roosen P. 1951. Les tests d'appréciation de la durabilité naturelle ou artificielle du bois. *Bull. Soc. Roy. For. De Belgique*, n° 10:393-415.
- Ross R.J., DeGroot R.C. et Nelson W.J. 1994. Technique for the nondestructive evaluation of biologically degraded wood. *Experimental Techniques*. **18**(5):29-32.
- Ryvarden L. et Gilbertson R.L. 1993. European polypores, part2. *Synopsis Fungorum* **7** : 1388-1743.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. et Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Saiki RK 1990. Amplification of genomic DNA. Dans : PCR Protocols: A guide to methods and applications, *Academic Press*, 15-19.

- Saitou N. et Nei M. 1987. The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Salas C., Lobos S., Larrain J., Salas L., Cullen D. et Vicu A.R. 1995. Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycetes *Ceritoporiopsis subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **21**:323-333.
- Scheffer T.C. et Cowling E.B. 1966. Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Ann. rev. phytopathol.* **4**:147-170.
- Schmidhalter D. et Canevascini G. 1992. Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus. *Coniophora puteana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:431-436
- Schmidt O. et Moreth-Kebernik U. 1989. Breeding and toxicant tolerance of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycologia Helvetica* **3**:303-314.
- Schmidt O. et Moreth-Kebernik U. 1995. Experiments for producing fruit-bodies of the dry rot fungus, *Serpula lacrymans* in culture. *Mycologia Helvetica* **7**:89-98.
- Schmidt O. et Moreth U. 1998a. Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. *Holzforschung* **52**:229-233.
- Schmidt O. et Moreth U. 1998b. Detection of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/10245, 8 p.
- Schmidt O. et Moreth U. 1998c. Identification of the Dry Rot Fungus, *Serpula lacrymans*, and the Wild Merulius, *S. himantioides*, by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). *Holzforschung* **53**:123-128.
- Schmidt O. et Moreth U. 1999. Identification of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by amplified ribosomal DNA restriction analysis. (ARDRA). *Holzforschung* **53**:123-128.
- Schmidt O. et Moreth U. 2000. Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrimans*. *Mycol. Res.* **14**:69-72.
- Schmidt O., Grimm K. et Moreth U. 2002. Molecular identity of species and isolates of the *Coniophora* cellular fungi. *Holzforschung* **56**:563-571.
- Schmidt O. et Moreth U. 2002. Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Sci. Technol.* **36**: 429-433.
- Schoemaker H.E., Harvey P.J., Bowen R.M. et Palmer J.M. 1985. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett.* **183**:7-12.
- Schroeder S., Kim S.H., Cheung W.T., Sterflinger K. et Breuil C. 2001. Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:163-167.

- Schroeder S., Kim S.H., Lee S., Sterflinger K. et Breuil C. 2002. The  $\beta$ -tubulin gene is a useful target for PCR-based detection of an albino *Ophiostoma piliferum* used in biological control of sapstain. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**:793-801.
- Schultz T.P., Hubbard T.F. Jr, Jin L., Fisher T.H. et Nicholas D.D. 1990. Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships. *Phytochem.* **29**:1501-1507.
- Schultz T.P., Harms T.W., Fisher T.H., Mc Murtrey K.D., Minn J. et Nicholas D.D. 1995. Durability of angiosperm heartwood: the importance of extractives. *Holzforschung* **49**:29-34.
- Schulze S., Bahnweg G., Tesche M. et Sandermann H. 1997. Identification techniques for *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* root and butt rot diseases. *Pflanzenkrankh Pflanzensch* **104**:433-451.
- Schulze S. et Bahnweg G. 1998. Identification of the genus *Armillaria* (Fr.:Fr.) Staude and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. in Norway Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) and determination of clonal distribution of *A. ostoyae*-genotypes by molecular methods. *Forstw. Cbl.* **117**, 98-114.
- Schüßler A., Schwarzott D. et Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, **105**:1413-1421.
- Selosse M.A. et Le Tacon F. 1995. Les associations mutualistes entre champignons et phototrophes : leur diversité et leur rôle dans la colonisation du milieu terrestre. *Cryptogam. Mycol.* **16**:1-43.
- Selosse M.A. et Durrieu G. 2004. Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003). *Acta Bot. Gallica.* **151**: 73-102.
- Siegel S.M. 1957. Non enzymatic macromolecules as matrices in biological synthesis: the role of polysaccharides in peroxidase-catalyzed lignin polymer from eugenol. *J. Am. Chem Soc.* **79**:1628-1632.
- Simon L., Bousquet J., Levesque R.C. et Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular plants. *Nature* **363**:67-69.
- Shain L. et Mackay J.P.G. 1973. Seasonal fluctuation in respiration if aging xylem in relation to heartwood formation in *Pinus radiata*. *Can. J. Bot.* **51**:737-741.
- Sherwood-Pike M.A. et Gray J. 1985. Silurian fungal remains: probable records of the Class Ascomycetes. *Lethaia* **18**:1-20.
- Shortle W.C. 1982. Decaying Douglas-fir wood: Ionization associated with resistance to a pulsed electric current. *Wood Science*, **15**:29-32.
- Stalpers J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol. Centraalb. Schimmelcult. Baarn* **16**:1-248.

- Stalpers J.A. 1996. The Aphyllophoraceous fungi. II. Keys to the species of the Hericiales. *Stud. Mycol.* **40**:1-185.
- Specht C.A., Novotny C.P. et Ullrich R.C. 1984. Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune*. *Current Genetics* **8**:219-222.
- Srivastata A.K. et Schlessinger D. 1991. Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* **73** : 631-638.
- Stickwel S., Szaro T.M., Weisburg W.G. et Sogin M.L. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**:231-241.
- Strullu D.G. 1985. Les mycorhizes. Encyclopedia of plant anatomy. *Gebrüder Borntraeger*. Berlin, 194p.
- Swann E.C. et Taylor J.W. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: a 18S Rdna gene perspective. *Mycologia* **85**:923-936.
- Swann E.C. et Taylor J.W. 1995. Phylogenetic diversity of yeast-producing basidiomycetes. *Mycol. Res.* **99**:1205-1210.
- Sweeney M., Harme M.A. et Mitchell D.T. 1996. Detection and identification of *Laccaria* species using repeated DNA sequence from *Laccaria proxima*. *Mycol. Res.* **100**:1515-1521.
- Swofford D.L. 2001. PAUP : Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tai D.S., Terasawa M., Chen C.L., Chang H.M. et Kirk T.K., 1983. Biodegradation of guaiacyl-syringyl lignins in wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Dans : Recent advances in lignin biodegradation research: Fundamentals and biotechnology, (eds.) Higuchi T., Chang H.M. et Kirk T.K., Uni Publishers Co, Tokyo, Japan, 44-63.
- Taylor N., Remy W., Hass H. et Kerp H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* **87**:560-573.
- Tanesaka E., Masuda H. et Kinugawa K. 1993. Wood degrading ability of Basidiomycetes that are wood decomposers, litter or mycorrhizal symbionts. *Mycologia* **85**:347-354.
- Taylor D.L. et Bruns T.D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two non photosynthetic orchids. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* **94**:4510-4515.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroten S., Kasuga T., Jeiser D.M., Hibbett D.S. et Fisher M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fung. Gen. Biol.* **31**:21-32.
- Theodore M.L., Stevenson T.W., Johnson G.C., Thornton J.D. et Lawrie A.C. 1995. Comparison of *Serpula lacrymans* isolates using RAPD PCR. *Mycol. Res.* **99**:447-450.



- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* **22**:4673-4680.
- Thorn R.G., Moncalvo J.M., Reddy C.A. et Vilgalys R. 2000. Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi. *Mycologia* **92**: 241-252.
- Tien M. et Kirk T. 1983. Lignin degrading enzymes from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* **221**:661-663.
- Tien M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their applications. *R.C. Cut. Rev. Microbiol.* **15**:141-168.
- Tien M. et Kirk T. 1988. Lignin peroxydase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**:238-248.
- Toft L. 1993. Immunological identification *in vitro* of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycol. Res.* **97**:290-292.
- Tuor U., Winterhalter K. et Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* **41**:1-17.
- Vainio E.J. et Hantula J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **104**:927-936.
- Vares T., Kalsi M. et Hatakka A. 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other lignolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3515-3520.
- Vigrow A., Button D., Palfreyman J.W., King B. et Hegarty B. 1989. Molecular studies on isolates of *Serpula lacrymans*. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/1421, 11.
- Vigrow A., Palfreyman J.W. et King B. 1991. On the identity of certain isolates of *Serpula lacrymans*. *Holzforschung* **45**:153-154.
- Walker W.F. et Doolittle W.F. 1982. Redividing the Basidiomycetes on the basis of 5S Rdna sequences. *Nature* **299**:723-724.
- Wariishi H., Valli K. et Gold M.H. 1989. Oxidation cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem.* **28**:6017-6023.
- Wendel J. F. et Doyle J. J. 1998. Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. In Soltis D., Soltis P. et Doyle J. Eds: Molecular Systematics of Plants. 2<sup>nd</sup> Ed. Chapman and Hall, New York.

White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans : PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, (eds.) Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et White T.J. Academic Press Inc., San Diego, Californie, 315-322.

Wilcox W.W. 1964. Preparation of decayed wood for microscopic examination. *Research note FLP-RN-056*. US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI.

Wood T.M., Garcia V. et Campayo V. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1 :147-161.

Woese C.R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*, Vol.97, no 15, 8392-8396.

Wu M.M.J., Cassidy J.R. et Pukkila P.J. 1983. Polymorphisms in DNA of *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* 7:783-392.

Wu O.X., Mueller G.M., Lutzoni F.M., Huang Y.Q. et Guo S.Y. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationships of eastern Asian and eastern North American disjunct *Suillus species* (fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. *Mol. Phylogenet.Evol.*17:37-47.

Zabel R.A. et Morrell J.J. 1992. Wood microbiology. Decay and its prevention. Academic Press, London and New York. 476p.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P. 2004. Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *System. Appl. Microbio.* 27: 380-395.

Zaremski A., Ducouso M., Prin Y. et Fouquet D. 1998. Characterization of tropical wood-decaying fungi by RFLP analysis of PCR amplified rDNA. *Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°.* IRG/WP/10251, 10 p.

Zaremski A. 1999. Caractérisation moléculaire des champignons lignivores du CIRAD-Forêt. Mémoire d'ingénieur . CNAM Montpellier France. 82p.

### **Normes utilisées :**

EN 350-1 : Durabilité naturelle du bois massif. Partie 1 : Guide des principes d'essai et de classification de la durabilité naturelle du bois.

EN 113: 1996-11 (European Standard). Wood preservatives. Determination of the toxic values against wood destroying Basidiomycetes cultured on an agar medium. Beuth Verlag, Berlin. 26 p.

CEN/TC 38/WG 23 N34. Durability of wood and wood-based products. Test methods for determining the natural durability of solid wood against wood destroying fungi. Part 1: Basidio., 22.02.2000.

